

## APPLICAZIONI DI PROTEOMICA PER LO STUDIO DEGLI EFFETTI DEL CONGELAMENTO SUL SEME EQUINO

### PROTEOMICS TO EVALUATE THE EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON POST-THAW STALLION SPERM

Bonaccini P<sup>1</sup>, Gaviraghi A<sup>2</sup>, Falomo ME<sup>1</sup>, Mantovani R<sup>1</sup>, Romagnoli S<sup>1</sup>, Hussein H<sup>2</sup>, Bonizzi L<sup>2</sup>, Roncada P<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Dip. Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD);<sup>2</sup>DIPAV, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Milano; <sup>3</sup>Istituto Sperimentale Italiano L. Spallanzani, Milano

**Parole chiave:** proteomica, stallone, seme congelato, plasma seminale

**Key words:** proteomics, cryopreservation, stallion, post-thaw, seminal plasma

**SUMMARY** - The success of cryopreservation with stallion sperm is lower than that of bull. However, increased application of assisted reproductive technologies in the equine breeding industry has encouraged the use of frozen semen to preserve superior genetics.

Stallion are commonly selected on the base of athletic performance record, pedigree and conformation. "Freezability" of semen is a term used to indicate survival rates of sperm populations by laboratory testing following a freeze-thaw cycle. 20-50% of stallion produce sperm of unacceptable freezability, and inter- and intra- stallion variations exist regarding freezability of sperm and in vivo fertility post-thaw. The aim of this study was to compare sperm protein expression profile from stallion with different semen quality post-thaw in order to detect biomarkers potentially related to fertility.

**INTRODUZIONE** – Con il miglioramento delle biotecnologie inerenti l'inseminazione artificiale (IA), la conservazione e il trasporto del materiale seminale, il potenziale riproduttivo maschile ha assunto un'importanza spiccata in termini zootecnici e commerciali. Nel cavallo la selezione degli stalloni impiegati come riproduttori si basa soprattutto sulla valutazione delle performance sportive e delle caratteristiche morfofunzionali dell'animale. Attualmente il valore riproduttivo di uno stallone è basato essenzialmente su parametri seminali classici (concentrazione, motilità progressiva e totale, morfologia, numero totale di spermatozoi), benché sia ormai noto che tale valore è il risultato di complesse interazioni di tipo genetico, ambientale e biologico. Il valore riproduttivo degli stalloni non è al momento quantificabile, come accade invece nel bovino, mediante l'assegnazione di un Indice Genetico Quantitativo basato su test di progenie, e i dati sull'Indice di Fertilizzazione (percentuale di concepimento per ciclo ovulatorio) sono sporadici, soprattutto in seguito all'utilizzo di seme congelato. E' noto infatti che la crioconservazione attiva reazioni ossidative e riduce il tempo di sopravvivenza degli spermatozoi post-scongelo. Rispetto alla specie bovina inoltre la qualità del seme congelato equino è molto inferiore, e solo il 20-50% degli stalloni hanno parametri seminali accettabili dopo lo scongelamento (1). Esistono poi forti variazioni inter- e intra- individuali nella congelabilità del seme degli stalloni non ancora chiarite con le convenzionali analisi del seme (2).

I primi lavori in letteratura di proteomica dello sperma sono del 1997, e da allora alcuni studi sono stati condotti sull'uomo (3,4,5) e su varie specie animali (6,7,8,9). Il vantaggio offerto dalla proteomica è quello di avere in una sola separazione elettroforetica bidimensionale un quadro completo delle proteine espresse in un preciso momento da un dato comparto cellulare di un individuo.

L'obiettivo di questo lavoro è l'analisi proteomica di campioni di seme congelato di stalloni con caratteristiche seminali differenti post-scongelo.

**MATERIALI E METODI** - Il seme congelato di 4 stalloni raccolto presso un Centro di Riproduzione Equina riconosciuto (Intermizoo spa, Vigonza, PD), è stato sottoposto ad analisi elettroforetiche bidimensionali. 4 paillettes commerciali sono state analizzate per ogni stallone, di cui si conoscono i valori relativi alla concentrazione, motilità totale (MOT) e spermatozoi progressivamente motili (PMS) post-scongelo, calcolate mediante dispositivo computerizzato CASA (Computerized Assisted Sperm Analyzer) (Hamilton

Thorne®, Biosciences). In accordo con le linee guida della WBFSH (world breeding federation for sport horses), che stabilisce come standard minimo di utilizzo del seme congelato un valore di 35% di PMS, i soggetti analizzati sono stati inquadrati come “good” (campione 6 e 7) e “bad” freezer (campione 3 e 5).

Il pellet cellulare ottenuto dopo 5 cicli di centrifugazione (2000G per 20’) è stato risospeso in 800 µL di tampone di estrazione (7 M urea, 2 M Tiourea, 4% Chaps, 1% DTT) e poi sonicato (5 cicli, in ghiaccio). Dopo centrifugazione (2000G per 5’) al fine di eliminare i residui cellulari, le proteine di ciascun campione sono state quantificate mediante 2D QuantiKit® (BioRad). E’ stata poi eseguita l’isoelettrofocalizzazione su strip non lineari a gradiente di pH immobilizzato (range 4-8) da 7 cm (10), mediante IPGphor II® (GE Healthcare) fino al raggiungimento di 70KV/h totali. Dopo equilibratura, le strip sono state trasferite su gel (SDS-PAGE 12,5% acrilamide) per la separazione in seconda dimensione su Mini Protean 2D cell® (Biorad). I gels ottenuti sono stati poi colorati utilizzando un protocollo standard di colorazione con Coomassie colloidale (11), e digitalizzati per l’analisi d’immagine degli spot con software dedicati.

**RISULTATI** - Sono stati identificati 124 spot. L’analisi comparativa ha evidenziato numerose differenze inter-individuali. Alcuni spot differentemente espressi tra i diversi campioni sono stati identificati mediante ricerca per confronto di mappe proteomiche esistenti in altre specie (4,6,7,8,9,12), in attesa di conferma mediante spettrometria di massa (Fig.1).

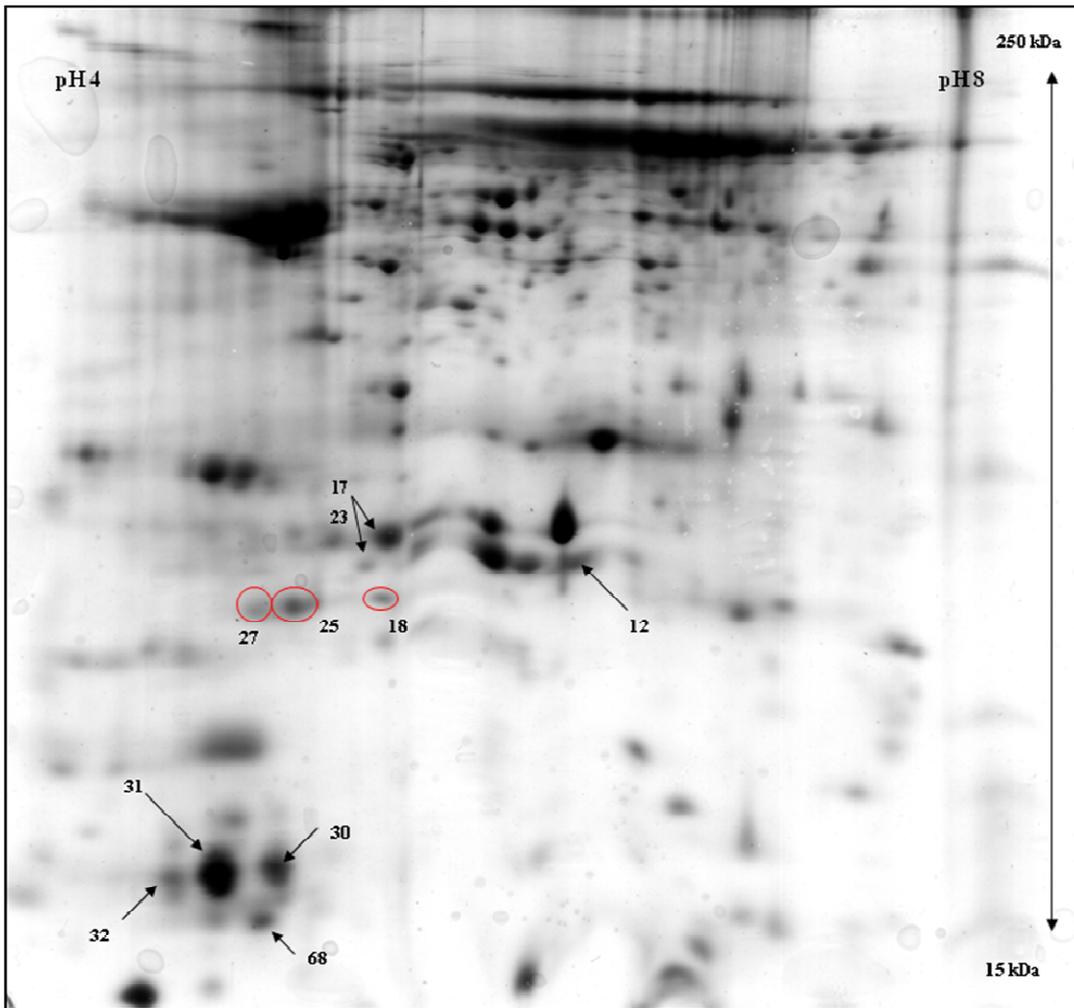
**DISCUSSIONE** - Gli spot 18, 25 e 27 corrispondono alla sp32 (proacrosin binding protein, 28-29kDa, pI 4.8-5.2) proteina implicata nella capacitazione e ben conservata tra le specie. Nei gel tale proteina appare sottoforma di una catena di tre spot con punti isolettrici lievemente dissimili, ad indicare probabilmente modificazioni post-traduzionali (12) quali la fosforilazione che avviene alla capacitazione. Lo spot 12 corrisponde alla CRISP3 (cysteine-rich secretory protein), 25 kDa, pI 7,54), proteina specie specifica del plasma seminale equino e correlata positivamente alla fertilità (8). Gli spot 17 e 23 corrispondono alle isoforme della kallikreina (27 kDa pI 5.51), correlate negativamente alla fertilità nello stallone (8). Gli spots 31 e 32 sono sovrapponibili alla aSFP (acidic protein bovin seminal plasma, 11-12 kDa pI 4.9), appartenente alla famiglia delle spermadesine (6), avente ruolo di protezione della membrana spermatica dalla perossidazione lipidica indotta dai ROS (reactive oxygen species) e risultata associabile ad una migliore congelabilità nel seme di toro (7). Gli spot 30 e 68, corrispondono alla BSP A1/A2 bovina (16 kDa, pI 4.7-5.5) detta anche PDC109, proteina del plasma seminale che si lega specificatamente ai fosfolipidi di membrana degli spermatozoi. La sua abbondanza nel plasma seminale dei tori con buona congelabilità, induce a ipotizzare che abbia un ruolo determinante nella protezione della membrana spermatica durante le procedure di crioconservazione (7).

| CAMPIONE | % MOT | % PMS | Conc/mL x10 <sup>6</sup> | Spot Overespressi | Spot Ipoespressi |
|----------|-------|-------|--------------------------|-------------------|------------------|
| 3        | 22.7  | 19.4  | 44.0                     | 17,18,23,25,27,   | 12,30,31,68      |
| 5        | 36.7  | 27.1  | 78.7                     | 18,               | 12,30,31,32,68   |
| 6        | 42.7  | 34.6  | 108.3                    | 12,30,31          | 18               |
| 7        | 59.9  | 46.3  | 67.2                     | 12,30,31,68       | 18,25,27,17,23   |

**Tab.1:** Confronto tra dati seminali post-scongelo e espressione di alcuni spot proteici

Questi dati confermano che la proteomica può essere di notevole ausilio in andrologia, in quanto gli spermatozoi sono cellule altamente specializzate, con una membrana molto complessa e ricca in proteine, e subiscono forti modificazioni del corredo proteico nel corso della maturazione. Inoltre, a causa del complesso riarrangiamento del DNA e dell’estrusione di gran parte del citoplasma, sono cellule dalle limitate difese contro i ROS (reactive oxygen species). E’ noto che la manipolazione e i metodi di crioconservazione amplificano gli effetti deleteri dei

ROS sul seme. Un'accurata indagine proteomica potrebbe svelare modificazioni a carico del corredo proteico indotte da alti livelli di ROS nel seme. L'utilizzo di questo approccio potrebbe inoltre permettere lo studio delle modificazioni dei parametri seminali allo scongelamento utilizzando protocolli diversi di crioconservazione. Infine l'identificazione di ulteriori spot con diversa espressione e la correlazione con parametri seminali e dati sulla fertilità potrebbero consentire l'individuazione di biomarkers predittivi del potenziale riproduttivo degli stalloni e la messa a punto di test di screening.



**Fig 1:** Mappa bidimensionale su pH 4-8. I numeri indicano gli spot significativi individuati

**BIBLIOGRAFIA** – **1)** Vidament M et al. (1997) *Theriogenology*, 48, 907-919. **2)** Crowe CAM et al. (2008) *Equine Vet J*, 40, 572-576. **3)** du Plessis SS et al. (2011) *Reprod Biol and Endocrinol*, 9, 36 **4)** Martinez-Heredia et al. (2006) *Proteomics*, 6, 4356-4369. **5)** Brewis IA, Gadella BM (2010) *Mol Hum Reprod*, vol 16, 2, 68-79. **6)** Mortarino M et al. (1998) *Electrophoresis*, 19, 797-801. **7)** Jobim MIM et al. (2004) *Theriogenology*, 61, 255-266. **8)** Novak S et al. (2010) *Theriogenology*, 74, 956-967. **9)** Cardozo JA et al. (2006) *Theriogenology*, 66, 841-850. **10)** Westermeier R (2001) *Electrophoresis in Practice*, WILEY-VCH, Weinheim. **11)** Rabilloud T (1996) *Electrophoresis*, 17, 813-829. **12)** Leahy T et al (2001) *Theriogenology*, 75, 962-971.