

# INDAGINE PROTEOMICA DEL SEME BOVINO PER LA VALUTAZIONE DELLA FERTILITA'

## SPERM PROTEOMICS IN HIGH AND LOW FERTILITY BULLS

Gaviraghi A.<sup>1</sup>, Deriu F.<sup>1</sup>, Soggiu A.<sup>1</sup>, Galli A.<sup>2</sup>, Bonacina C.<sup>2</sup>, Bonizzi L.<sup>1</sup>, Roncada P.<sup>2</sup> <sup>1</sup>Dip. Patologia Animale Igiene e Sanità Pubblica Vet. Milano. <sup>2</sup>Istituto Sperimentale Italiano L. Spallanzani, Milano.

**Parole chiave:** proteomica, fertilità, spermatozoi, bovino

**Key words:** proteomics, fertility, spermatozoa, bovine

**SUMMARY** – Infertility is one of the most common problems and main cause of economic losses in dairy production. Bull infertility represent a significant component on unsuccessful pregnancy. In this study, proteomic analysis was applied to compare the sperm protein expression profile from high and low fertility bulls. It has been found that expression of several proteins (9 different 2-D spots) is related to high and low fertility bulls ( $p < 0.05$ ). These proteins are involved in sperm-egg interaction and cell cycle regulation. Proteomic analysis of sperm can be a valuable tool to identify protein changes related to fertility.

**INTRODUZIONE** – Nell'allevamento del bovino da latte ad alta produzione, la gestione riproduttiva della mandria (quota di rimonta, costi veterinari per la gestione di patologie della sfera genitale, costo del seme congelato) rappresenta il problema maggiore ed incide per una buona parte sui costi di produzione. Si osserva infatti un'associazione negativa fra il livello produttivo degli allevamenti e la fertilità. Ciò è legato sia a fattori genetici (alta produzione ed inbreeding) sia a fattori fisiologici (dismetabolie da alta produzione) (1). Molti progressi sono stati fatti sia a livello di management aziendale (ricoveri, attrezzature, alimentazione, igiene) sia per diminuire l'ipofertilità femminile (controllo ginecologico programmato) mentre ancora scarsi sono gli studi e gli interventi fatti per controllare l'effetto del toro sull'efficienza riproduttiva. Alcuni studi hanno messo in evidenza, soprattutto se viene utilizzata l'inseminazione artificiale, che una percentuale significativa dell'insuccesso riproduttivo è riconducibile alla scarsa fertilità del seme e non a problemi legati alla bovina (2). Considerando che gli schemi di selezione e la gestione riproduttiva nell'allevamento della bovina da latte si basano sull'uso dell'inseminazione artificiale (IA) è facile capire l'importanza della valutazione del livello di fertilità del toro riproduttore. Attualmente, il metodo maggiormente utilizzato è il nonreturn rate (NRR) ossia la percentuale di vacche che non ritornano in calore a una distanza di 56 giorni dall'inseminazione artificiale sul totale delle vacche sottoposte a inseminazione (3,4). E' stato dimostrato che esiste un'associazione fra il numero di spermatozoi "funzionali" e la fertilità, fino al raggiungimento di un valore soglia, oltre al quale la fertilità non aumenta (2). La fertilità associata a tale valore soglia varia fra toro e toro, rappresentando il livello di fertilità del riproduttore. L'analisi proteomica differenziale associata all'analisi statistica multivariata può costituire un sistema biotecnologico innovativo per rilevare le modificazioni nell'espressione del profilo proteico degli spermatozoi di tori ad elevata e bassa fertilità. Tale approccio può consentire di individuare possibili marker proteici indicatori di fertilità per la messa a punto di test innovativi.

**MATERIALI E METODI** – Sono stati selezionati tre tori ad alta fertilità e tre a bassa fertilità. In base ai valori di ERRCR (Estimated Relative Conception Rates) calcolato utilizzando i dati derivanti dai Controlli Funzionali a disposizione dell'ANAFI. Il dato misurato è stata la percentuale di non ritorni a 56 giorni, aggiustato per una serie di fattori di variabilità (azienda, anno e mese di inseminazione, ordine di parto della vacca, toro, centro produzione seme, energia spesa nella produzione di latte al 3,5% di grasso e al 3,2% di proteine ecc.). L'ERRCR rappresenta quindi, l'effetto del toro sulla percentuale di non ritorni delle vacche inseminate in azienda, espresso come differenza rispetto alla media della percentuale di non ritorni ottenuti con il seme degli altri tori. Il data-set degli ERRCR è stato analizzato e sono stati individuati due gruppi di tori ad alta e bassa fertilità, con una attendibilità media della stima di ERRCR pari al 96,7% (con minimo 92% e massimo 99%). I 6 tori presi in esame avevano i seguenti valori di

ERCR: T1 bassa fertilità (-4,74), T2 bassa fertilità (-3,93), T3 bassa fertilità (-3,52), T4 alta fertilità (+2,39), T5 alta fertilità (+2,26), T6 alta fertilità (+2,62).

Tre paillette di seme commerciale di ogni singolo toro sono state scongelate in bagno termostato a 35°C per 2 minuti, il contenuto è stato centrifugato a 10000 g per 10 minuti per ottenere il pellet di spermatozoi. Dopo aver eliminato il surnatante, sono stati effettuati 5 lavaggi in PBS per eliminare totalmente il mestruo di congelamento. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 200 µl di tampone di estrazione 7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 30mM Tris e sonicato (3 cicli da 20 secondi alla massima potenza, in ghiaccio). Dopo aver centrifugato per eliminare i residui cellulari (14000 RPM, 20°C ,60 minuti), il contenuto proteico dei campioni è stato quantificato utilizzando il 2D Quant kit (GE Healthcare). La prima dimensione è stata eseguita utilizzando strip con range di pH 3-10 NL (non lineare) da 13cm (GE Healthcare) in cui sono stati seminati mediante cup loading 70 µg di proteine totali. L'IEF è stata effettuata utilizzando l'Ettan IPGPhor III (GE Healthcare) fino al raggiungimento di 85KV/h totali. Dopo equilibratura, le strip sono state trasferite su gel SDS-PAGE al 12% di acrilamide per la separazione in seconda dimensione effettuata su Protean II xi 2-D Cell (Biorad). I gel sono stati colorati usando la colorazione al nitrato d'argento. Dopo l'acquisizione dei gel è stata eseguita mediante software dedicato l'analisi d'immagine (Image Master 2D Platinum – Ge Healthcare). Per l'analisi delle componenti principali (PCA) e l'analisi della varianza (ANOVA) è stato utilizzato il modulo software Progenesis STATS (Nonlinear Dynamics).

**RISULTATI** – In figura 1 e 2 sono riportate le mappe bidimensionali di riferimento di seme bovino ad alta e bassa fertilità.

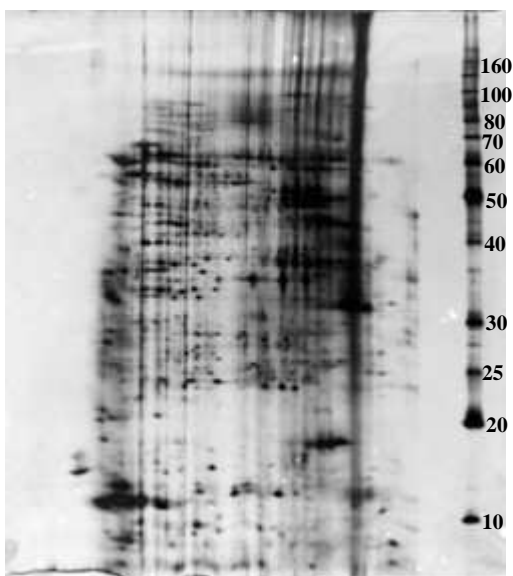


Fig. 1 Mappa bidimensionale di seme di toro a bassa fertilità

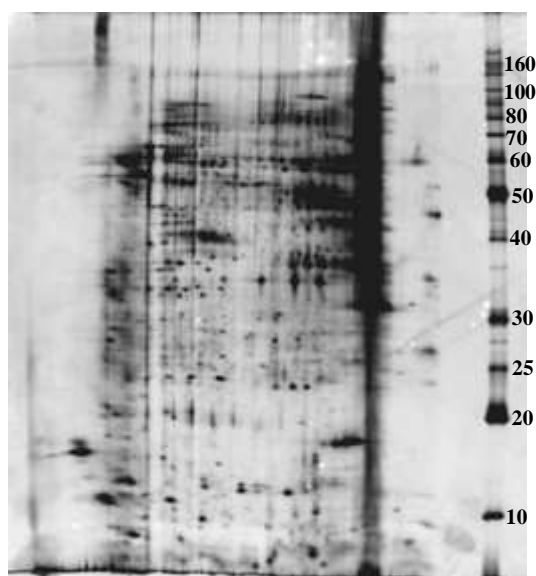


Fig. 2 Mappa bidimensionale di seme di toro ad alta fertilità

L'analisi delle componenti principali, eseguita in cieco sulle mappe dei tori, ha permesso la divisione degli animali nei due gruppi, elevata e bassa fertilità, in accordo con l'ERCR. La varianza cumulativa è il principale parametro dell'efficacia del metodo PCA, dato che quantifica quanto accurata è la visualizzazione dei dati ottenuta dal piano principale. Nel nostro esperimento, le prime due componenti principali (cioè il piano principale) spiegano complessivamente il 96,3% della varianza totale fornendo una rappresentazione soddisfacente considerando che generalmente si considera il metodo PCA efficace quando il piano principale rappresenta l'80-90% della varianza totale dei dati, cioè quando la parte di "informazione persa" (rappresentata dalla varianza delle altre componenti principali: Comp.3, Comp.4, etc.) si aggira sul 10-20% del totale.

Grazie all'associazione dei dati ottenuti dall'analisi statistica e quelli dell'analisi d'immagine, sono state identificate le proteine che, variando il loro livello di espressione, caratterizzano i

soggetti ad alta e bassa fertilità. In figura 3 sono riportati i risultati dell'analisi di immagine; i numeri presenti rappresentano le proteine che cambiano il livello di espressione. Le proteine racchiuse nel riquadro di figura 3 mostrano un aumento nell'espressione nei soggetti a bassa fertilità rispetto a quelli ad alta fertilità. Per quanto riguarda lo spot 1757, l'espressione di questa proteina è invece più elevata nei tori ad alta fertilità. Le differenze di espressione valutate mediante ANOVA a 1 via e riportate in figura 4, sono risultate essere statisticamente significative ( $p < 0.05$ ).

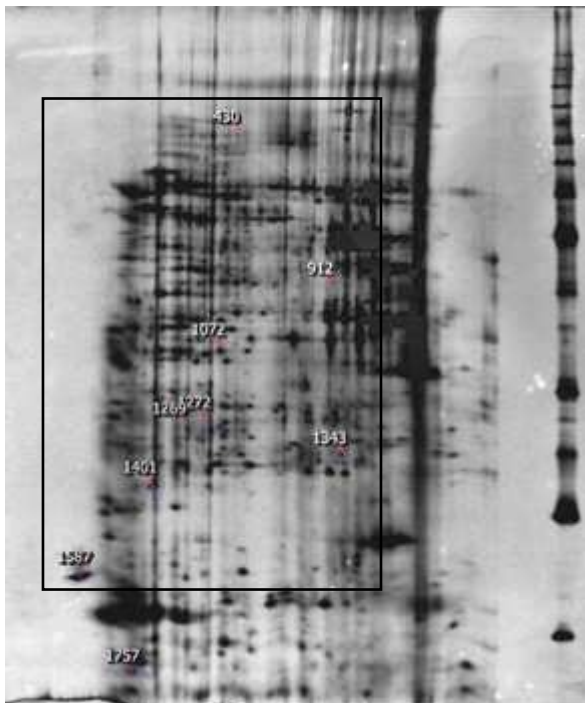


Figura 3. Proteine che variano il livello di espressione.

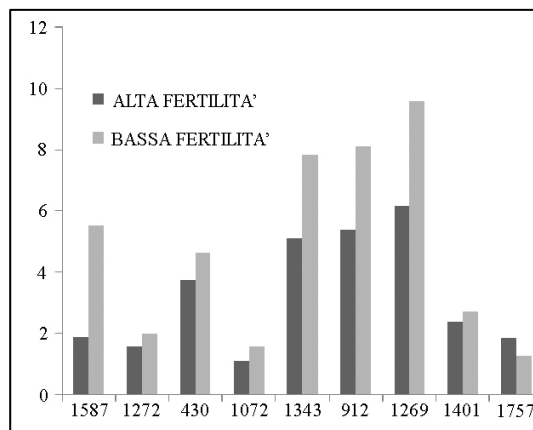


Figura 4. Variazioni nell'espressione proteica tra seme di toro ad alta e bassa fertilità. In tutti i casi  $p < 0,05$ .

Le principali differenze si osservano nell'espressione di proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare e nell'interazione fra spermatozoo e cellula uovo. Queste differenze potrebbero spiegare la riduzione della fertilità dovuta a errori nel riconoscimento fra spermatozoo e oocita o problemi a carico della regolazione del ciclo cellulare (5,6). Questi due passaggi sono di estrema importanza per la corretta fecondazione della cellula uovo e per il successivo sviluppo dell'embrione.

Lo studio e la validazione dei marker proteici identificati potrà consentire lo sviluppo di test innovativi rapidi da utilizzare nei centri di produzione di seme per avere una buona stima del livello di fertilità di un toro. Questo permetterebbe un notevole risparmio nella valutazione di questo parametro visto che l'utilizzo della percentuale di non ritorni richiede, per essere corretto, un numero elevato di inseminazioni, possibilmente distribuite in più aziende, e un modello statistico in grado di aggiustare il dato per i maggiori fattori di variabilità. Avendo a disposizione in tempi brevi il valore di fertilità associato al toro si potrebbe ottimizzare la produzione di seme congelato ottenendo dosi contenenti il numero di spermatozoi adeguato al raggiungimento del massimo della fertilità di quel toro, consentendo nel frattempo la produzione del maggior numero di dosi.

**BIBLIOGRAFIA** – 1) Bach A et al (2008) J. Dairy Sci. 91(8), 3259-3267. 2) DeJarnette J.M et al. (2004) J. Dairy Sci. 87(E. Suppl.), E93-E104. 3) Koops WJ et al (1995) J. Dairy Sci. 78, 921-928. 4) Liu Z et al (2008) J. Dairy Sci. 91, 4333-4343. 5) Peddinti D et al (2008) BMC Syst Biol. 22, 2-19. 6) de Mateo S et al (2007) Proteomics, 7, 4264-4277.

**RINGRAZIAMENTI** - Si ringrazia l'ANAFI nella figura del suo direttore dr. Giorgio Burchiellaro, per aver fornito i dati ERCR. Ricerca eseguita con fondi Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani.