



Co-funded by
the European Union

SUIS.2 [Suinicoltura
Italiana
Sostenibile

FONDO EUROPEO AGRICOLO PER LO SVILUPPO RURALE: L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI

Programma di Sviluppo Rurale Nazionale 2014/2020 - Sottomisura 10.2

SUIS.2 – SUINICOLTURA ITALIANA SOSTENIBILE.2

PROGETTO COFINANZIATO DAL FEASR - CUP: J89J21000970005

NEWSLETTER SUIS.2 04_2021

La gestione dei verri e del materiale seminale per migliorare l'efficienza riproduttiva degli allevamenti di suino pesante

Giulia Pozzato, Raffaella Mosaner – Centro FA ANAS

La presente nota ha lo scopo di informare in modo dettagliato e documentato con numerosi riferimenti bibliografici sullo stato delle conoscenze circa le caratteristiche morfologiche e fisiologiche che determinano la capacità fecondante degli spermatozoi. Inoltre, sono descritti gli accorgimenti adottati dal Centro FA ANAS nella gestione dei verri e della raccolta e valutazione del materiale seminale. L'attività svolta ha permesso di assicurare la distribuzione di dosi ad alta capacità fecondante e di avviare la raccolta di numerose e puntuali informazioni che saranno oggetto di analisi nell'ambito del Progetto SUIS.2 per indagare la variabilità genetica della fertilità maschile e mettere a punto strategie per contribuire al miglioramento dell'efficienza riproduttiva.

Lo spermatozoo: caratteristiche morfologiche e funzionali

La cellula spermatica è altamente specializzata per raggiungere e fertilizzare degli ovociti. In particolare, essa è caratterizzata da dimensioni molto contenute ($47.2 \mu\text{m} \pm 1.5 \mu\text{m}$ di lunghezza totale) e dalla capacità di muoversi e interagire con l'ambiente che la circonda [1]. Esistono notevoli differenze morfologiche e soprattutto dimensionali delle cellule spermatiche nelle diverse specie animali appartenenti alla classe dei mammiferi, ma sembrerebbe che l'organizzazione strutturale sia pressoché universale e suddivisa in: *regione della testa*, *tratto intermedio* e due regioni del flagello, *tratto principale* e *porzione terminale* [2].

La regione della *testa*, contiene materiale genetico con corredo cromosomico aploide (nel suino 19 cromosomi) e tutti gli elementi molecolari indispensabili per il riconoscimento e la fusione con il gamete femminile. La componente fondamentale è pertanto rappresentata dal nucleo, ovoidale e appiattito, costituito da cromatina estremamente condensata grazie alla presenza di una speciale classe di proteine basiche, denominate *protamine*. Queste hanno la capacità di rendere il DNA inerte sia dal punto di vista metabolico che

Responsabile dell'informazione:

Autorità di Gestione:



associazione nazionale allevatori suini

mipaaf

ministero delle
politiche agricole
alimentari e forestali



Co-funded by
the European Union

SUIS.2 [Suinicoltura
Italiana
Sostenibile]

FONDO EUROPEO AGRICOLO PER LO SVILUPPO RURALE: L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI

Programma di Sviluppo Rurale Nazionale 2014/2020 - Sottomisura 10.2

SUIS.2 – SUINICOLTURA ITALIANA SOSTENIBILE.2

PROGETTO COFINANZIATO DAL FEASR - CUP: J89J21000970005

trascrizionale fino al momento della loro sostituzione dalle proteine istoniche di origine ovocitaria al momento della fecondazione. Insieme alle molecole di DNA, negli spermatozoi maturi si trova anche mRNA (RNA messaggero) immagazzinato sotto forma di ribonucleoproteine in forma inattiva e, recenti studi ne hanno dimostrato una notevole importanza nella fertilizzazione, nello sviluppo embrionale e, pertanto, nella qualità degli spermatozoi stessi [3,4].

La parte anteriore del nucleo è ricoperta dall'*acrosoma*, un sottile sacco membranoso ricco di enzimi, quali l'acrosina, la ialuronidasi e l'enzima di penetrazione della corona, indispensabili per la dissociazione delle cellule della corona radiata dell'ovocita nel corso della fecondazione e la degradazione enzimatica della zona pellucida. Posta tra la testa e il flagello dello spermatozoo vi è la regione del *tratto intermedio*. Essa è costituita da l'assonema, un complesso filamentoso formato da una coppia di microtubuli centrale circondata da nove coppie disposte esternamente e da numerosi mitocondri, strutture indispensabili per l'origine del moto cellulare e del relativo rifornimento energetico. La regione della coda si compone dal *segmento principale*, che a differenza del *tratto terminale* è caratterizzato dalla presenza dell'assonema e da una guaina fibrosa che lo circonda, conferendo maggior stabilità agli elementi contrattili del flagello e forza di propulsione nel corso del moto.

Spermatozoi caratterizzati da testa di minori dimensioni, tratto intermedio e flagello più lunghi del normale portano a maggior aerodinamicità e rapidità del movimento spermatico [5]. Inoltre, nonostante le cellule spermatiche presentino leggere differenze di dimensioni le une dalle altre, gli studi presenti in letteratura non hanno riportato differenze statisticamente significative tra le diverse razze suine e ibridi commerciali impiegati nell'industria suinicola [6,7].

Le principali anomalie spermatiche

La qualità del seme di un verro dipende da numerosi fattori legati sia all'animale (età, razza, stato di salute, stato nutrizionale, funzionalità endocrina, dimensioni testicolari, funzionalità delle ghiandole sessuali accessorie) sia alla sua gestione (management, stabulazione, gestione dei fattori stressanti, stimolazione sessuale prima del prelievo, igiene ambientale, tecnica di prelievo) sia alla gestione e manipolazione del materiale seminale stesso (stress termici, biochimici, meccanici e osmotici) [8].

L'insieme di questi fattori possono comportare quindi l'insorgenza di anomalie che possono interessare una o più regioni della cellula spermatica, modificandone la capacità fecondante. La qualità del seme, intesa come l'insieme di concentrazione, parametri cinematici e morfologici, costituisce uno dei fattori primari per la scelta, tra i verri in possesso dei requisiti genetici (SIB Test) e morfo-funzionali, dei verri da destinare alla FA presso un centro di raccolta autorizzato.

Generalmente, in letteratura le anomalie spermatiche vengono classificate come primarie se di origine spermatogonica, secondarie se collegate alla maturazione epididimale e terziarie, date da fenomeni di tipo ambientale e post-raccolta e manipolazione del materiale seminale [9]. Ma in realtà ciascuna alterazione

Responsabile dell'informazione:



associazione nazionale allevatori suini

Autorità di Gestione:



ministero delle
politiche agricole
alimentari e forestali



Co-funded by
the European Union

SUIS.2 [Suinicoltura
Italiana
Sostenibile]

FONDO EUROPEO AGRICOLO PER LO SVILUPPO RURALE: L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI

Programma di Sviluppo Rurale Nazionale 2014/2020 - Sottomisura 10.2

SUIS.2 – SUINICOLTURA ITALIANA SOSTENIBILE.2

PROGETTO COFINANZIATO DAL FEASR - CUP: J89J21000970005

morfologica e/o funzionale della cellula spermatica può avere origini diverse e non sempre ben definibili, pertanto di tipo multifattoriale.

In generale i difetti a carico della regione della testa sono di tipo primario, ossia legati ad alterazioni nel corso della spermatogenesi a livello testicolare. Questo comporta ad anomalie cromosomiche e presenza di materiale mielinico e/o fibroso nello spazio perinucleare e vacuolizzazioni del nucleo più o meno diffuse e pertanto incapacità di legarsi all'ovocita e di fecondarlo. Alcuni esempi sono la testa di forma circolare, piriforme, allungata di 1/3 rispetto al normale, di dimensioni minori (microcefalia) o maggiori (macrocefalia), ripiegata longitudinalmente o trasversalmente, spermatozoi con doppie e/o triple teste associati o meno a code arrotolate.

La presenza di teste e code staccate, invece può dipendere sia da errori di manipolazione del campione di materiale seminale all'interno del laboratorio di analisi, sia da anomalie della testa e del tratto intermedio, che da immaturità spermatica e pertanto da cause di tipo epididimale [1,10].

La perdita d'integrità della membrana acrosomiale come anche l'acrosoma espanso e vacuolizzato è associabile a disfunzioni epididimali, ma anche ad un'eccessiva senescenza spermatica e ad una scarsa frequenza di raccolta del materiale seminale.

Le alterazioni che possono interessare il tratto intermedio sono date da un suo assottigliamento oppure ingrossamento che a livello ultrastrutturale può essere dovuto all'assenza dei microtubuli centrali dell'assonema, alla presenza di mitocondri lisci o disposti esternamente al manicotto mitocondriale. Anche in questo caso le cause possono essere sia di tipo primario, che secondario come essere dovute alla senescenza cellulare oppure, nel caso del seme congelato, ad uno scorretto protocollo di crioconservazione che può inficiare sul sistema di perossidazione dei lipidi a livello mitocondriale [11].

La regione della coda, invece, può presentarsi doppia, ripiegata attorno alla goccia citoplasmatica, tratto intermedio e testa con conseguente immobilità o motilità fortemente alterata (di tipo circolare). L'origine può essere anche in questo caso di tipo primario (soprattutto in caso di criptorchidismo) che secondario, dovuto perlopiù a stress osmotico nell'ambiente epididimale con conseguente difficoltà di migrazione della goccia citoplasmatica lungo il flagello.

L'anomalia della coda arrotolata, invece può essere dovuta sia a stress termici nel corso della manipolazione del materiale, sia a anomala perdita della goccia protoplasmatica che alla presenza di sostanza mielinica o materiale fibroso a livello ultrastrutturale. Inoltre, spesso è associata ad anomalie della testa.

Per quanto riguarda le cellule spermatiche con flagello apparentemente normale o corto, recenti studi hanno evidenziato come la presenza di vescicole e l'assenza della guaina fibrosa o dei microtubuli centrali dell'assonema comportano a totale immobilità spermatica. Nello specifico è stato individuato un gene, denominato KPL2, indispensabile per la corretta formazione e organizzazione dell'assonema e pertanto per la cinetica spermatica [12].

Un'eccessiva frequenza di raccolta del materiale seminale, lo stress stagionale e le alterazioni a livello epididimale comportano la presenza più o meno abbondante di spermatozoi immaturi nell'ejaculato. Questi sono caratterizzati dalla presenza della goccia protoplasmatica, ossia il residuo di citoplasma dato dall'allungamento e condensazione della regione della testa in seguito a maturazione. Tale goccia viene definita prossimale se collocata fino a 4 µm dalla porzione terminale della testa (coinvolgendo quindi testa o

Responsabile dell'informazione:

Autorità di Gestione:



mipaaf

ministero delle
politiche agricole
alimentari e forestali



Co-funded by
the European Union

SUIS.2 [Suinicoltura
Italiana
Sostenibile

FONDO EUROPEO AGRICOLO PER LO SVILUPPO RURALE: L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI

Programma di Sviluppo Rurale Nazionale 2014/2020 - Sottomisura 10.2

SUIS.2 – SUINICOLTURA ITALIANA SOSTENIBILE.2

PROGETTO COFINANZIATO DAL FEASR - CUP: J89J21000970005

tratto intermedio) oppure distale se presente sul tratto principale o terminale del flagello. Questa può comprimere il manicotto mitocondriale e le fibre dense della cellula spermatica portando a ridotta motilità e capacità di interazione con l'ovocita al momento della fecondazione [13]

Le procedure e la valutazione del materiale spermatico per garantire la qualità delle dosi distribuite

L'attività del nuovo Centro di produzione seme ANAS di Gualtieri (RE) è fondamentale per l'attuazione dei programmi genetici delle tre razze di riferimento delle DOP: Large White, Landrace e Duroc italiane. L'operatività è organizzata per tenere sotto controllo i fattori che influiscono sulla qualità del materiale seminale.

- Gestione dei verri

Particolare attenzione è riservata alla verifica anatomico-funzionale, prima dell'introduzione, dell'apparato riproduttivo dei verri tramite ecografia testicolare, alla messa a disposizione di uno spazio maggiore rispetto a quello previsto dalle norme sul benessere, alla precisa somministrazione della razione alimentare giornaliera - distribuita con un sistema automatizzato di precisione per evitare errori umani, alla frequenza dei prelievi.

A questo proposito, è previsto un unico prelievo settimanale nonostante in letteratura sia documentata la possibilità di effettuare fino a 3 salti a verro nell'arco di due settimane [3,9]. Questa scelta è stata fatta perché considerata un giusto compromesso fra limitazione del depauperamento delle riserve epididimali con conseguente riduzione del rischio di elevata presenza di spermatozoi immaturi nell'eiaculato e produttività.

Inoltre, i verri sono allevati in locali climatizzati da raffrescatori adiabatici evaporativi ad acqua che permettono di mantenere una temperatura confortevole al livello del suolo, dove si trovano operatori ed animali, senza dover raffreddare tutta l'aria del capannone, con vantaggi anche da un punto di vista del consumo energetico e dell'impatto ambientale.

- Gestione della raccolta, trattamento e valutazione del materiale spermatico

La raccolta del materiale spermatico e i successivi trattamenti, tra cui anche quelli di valutazione, sono attuati per evitare shock termici e osmotici, che possono danneggiare la morfologia e la cinetica spermatica. Pertanto, il materiale seminale viene raccolto con un sacchetto munito di filtro e posto all'interno di una termos mantenuto a 37° C prima del prelievo. Il materiale così raccolto viene tempestivamente tamponato in laboratorio con un extender di ultima generazione alla medesima temperatura di arrivo. Inoltre, tutti i materiali consumabili che vengono a contatto con il seme per la sua valutazione sono posti in bagnetti termo-riscaldati, piastre riscaldate e termo-blocchi impostati alla temperatura fisiologica di 37° C.

Responsabile dell'informazione:



associazione nazionale allevatori suini

Autorità di Gestione:

mipaaf

ministero delle
politiche agricole
alimentari e forestali



Co-funded by
the European Union

SUIS.2 [Suinicoltura
Italiana
Sostenibile

FONDO EUROPEO AGRICOLO PER LO SVILUPPO RURALE: L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI

Programma di Sviluppo Rurale Nazionale 2014/2020 - Sottomisura 10.2

SUIS.2 – SUINICOLTURA ITALIANA SOSTENIBILE.2

PROGETTO COFINANZIATO DAL FEASR - CUP: J89J21000970005

Sono adottate le tecnologie di analisi avanzate che consentono di ottimizzare i tempi di lavoro e soprattutto di ottenere grandi quantità di dati per ogni singola analisi, discriminando in maniera immediata ed affidabile un seme di qualità superiore da uno di scarsa qualità [14]. In particolare, presso il Laboratorio del Centro FA ANAS è in uso il sistema HTM Ceros-CASA (Analisi del Seme Assistita da Computer). Questo permette di analizzare dalle 800 alle 1000 cellule spermatiche/eiaculato rilevando non solo i parametri cinematici, come motilità totale e progressiva e relative caratteristiche microcinematiche (es: rettilineità del movimento, linearità, velocità curvilinea, media e rettilinea, frequenza del battito del flagello e di oscillazione della testa, ecc..) ma anche le caratteristiche morfologiche. Tra queste troviamo la misurazione dell'area, dell'ellitticità, della regolarità della testa per la rilevazione di anomalie a carico di questa regione; i difetti della porzione intermedia e del flagello, quali la coda ripiegata, la coda arrotolata, spezzata, doppia, tratto intermedio inspessito o ripiegato con goccia citoplasmatica prossimale e la presenza di gocce citoplasmatiche prossimali e distali.

L'analisi di immagine non solo ha la potenzialità di fornire avanzamenti considerevoli nella quantificazione e nell'oggettività della valutazione morfologica ma anche della riproducibilità dei dati ottenuti [15].

Inoltre, attraverso l'analisi visiva al microscopio viene rilevata e valutata l'eventuale presenza di centri di agglutinazione e di aggregazione. Considerando aggregazione non-specifica l'adesione tra spermatozoi mobili o immobili a filamenti di muco, a residui di tapioca, alla componente cellulare non nemaspermica o a detriti. Mentre agglutinazioni specifiche quelle in cui gli spermatozoi mobili aderiscono tra loro in seguito alla presenza di anticorpi anti-spermatozoo nel caso di ipofertilità immunologica oppure a elevata carica microbica nell'eiaculato. Tra le altre cause di agglutinazione specifica che le buone pratiche di laboratorio adottate da ANAS prevengono si ricordano lo shock termico e l'uso di materiali non idonei e/o spermotossici. In accordo con le linee guida WHO queste vengono classificate in base: alla regione spermatica coinvolta (es: agglutinazione testa-testa, testa-coda, coda-coda, miste, groviglio di teste e code avviluppate); alle dimensioni dei centri di agglutinazione (grado 1 piccoli, se isolati e con <10 spermatozoi coinvolti in ciascuna agglutinazione; grado 2 medi, se coinvolgono da 10 ai 50 spermatozoi ciascuna; grado 3 grandi, se coinvolgono >50 spermatozoi e pochi sono liberi; grado 4, agglutinazione grossolana, dove tutti gli spermatozoi sono agglutinati e le agglutinazioni sono tra loro interconnesse).

Altrettanto importante è la rilevazione della presenza di tracce di urina, caratterizzata da eiaculato da odore acre e presenza di cristalli di urati e ossalati; sangue e cellule non nemaspermiche (eritrociti, cellule epiteliali, cellule rotonde infiammatorie quali leucociti e granulociti neutrofili e cellule germinali immature).

In accordo con quanto riportato in letteratura, un materiale seminale di qualità dovrebbe possedere tra il 70% e il 90% (mediamente >75%) di spermatozoi strutturalmente e morfologicamente normali e pertanto esenti da anomalie [9,17]. Il materiale seminale validato da ANAS per la distribuzione deve possedere una motilità > 75%. Il processo in uso prevede il controllo del rispetto dello standard qualitativo sia del materiale spermatico sia dei relativi lotti prodotti per la distribuzione agli allevamenti. Inoltre, nel corso della settimana vengono ricontrollati campioni dei lotti prodotti per monitorare eventuali variazioni qualitative durante la conservazione. Questa meticolosa operatività di verifica di ogni passaggio del processo produttivo e di costante monitoraggio ed elaborazione dei dati ha permesso il raggiungimento di un alto standard qualitativo, che consente la distribuzione di dosi refrigerate che a distanza di 7 giorni dal prelievo hanno ancora un'alta capacità fecondante perché contengono mediamente 2 miliardi/ml di spermatozoi vitali.

Responsabile dell'informazione:

Autorità di Gestione:



associazione nazionale allevatori suini

mipaaf

ministero delle
politiche agricole
alimentari e forestali



Co-funded by
the European Union

SUIS.2 [Suinicoltura
Italiana
Sostenibile

FONDO EUROPEO AGRICOLO PER LO SVILUPPO RURALE: L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI

Programma di Sviluppo Rurale Nazionale 2014/2020 - Sottomisura 10.2

SUIS.2 – SUINICOLTURA ITALIANA SOSTENIBILE.2

PROGETTO COFINANZIATO DAL FEASR - CUP: J89J21000970005

- I dati per la valutazione della fertilità maschile

I dati registrati con l'attività sopra descritta costituiscono una preziosa fonte di informazioni che sono oggetto di indagine nell'ambito del progetto SUIS.2 (PSRN 10.2). L'obiettivo è verificare la variabilità genetica della produzione di materiale seminale idoneo per poter mettere a punto la valutazione genetica della fertilità maschile e contribuire al miglioramento dell'efficienza riproduttiva delle tre razze del suino pesante per le produzioni DOP.

Bibliografia

1. Bonet S, Briz M. New data on aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. *Theriogenology*. 1991;35: 725–730. doi:10.1016/0093-691x(91)90413-8
2. Dumba BS, O'Rand MG. A comparative overview of mammalian fertilization. New York: Plenum Press; 1991.
3. Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M. Boar reproduction: fundamentals and new biotechnological trends. 2013th ed. Springer Science & Business Media;
4. Hwang JY, Mulligan BP, Kim H-M, Yang B-C, Lee C-K. Quantitative analysis of sperm mRNA in the pig: relationship with early embryo development and capacitation. *Reprod Fertil Dev*. 2013;25: 807–17. doi:10.1071/RD12160
5. Górski K, Kondracki S, Wysokińska A. Ejaculate Traits and Sperm Morphology Depending on Ejaculate Volume in Duroc Boars. *J Vet Res*. 2017;61: 121–125. doi:10.1515/jvetres-2017-0015
6. Nicander L, Bane A. Fine structure of boar spermatozoa. *Z Für Zellforsch Mikrosk Anat*. 1962;57: 390–405. doi:10.1007/BF00343326
7. Gil MC, García-Herreros M, Barón FJ, Aparicio IM, Santos AJ, García-Marín LJ. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*. 2009;71: 254–263. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.07.007
8. Žaja IŽ, Samardžija M, Vince S, Majić-Balić I, Vilić M, Đuričić D, et al. Influence of boar breeds or hybrid genetic composition on semen quality and seminal plasma biochemical variables. *Anim Reprod Sci*. 2016;164: 169–176. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.11.027
9. B. Hafez editor, E. S. E Hafez (Elsayed Saad Eldin) editor. *Reproduction in farm animals*. Seventh edition.. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

Responsabile dell'informazione:

Autorità di Gestione:



mipaaf
ministero delle
politiche agricole
alimentari e forestali



Co-funded by
the European Union

SUIS.2 [Suinicoltura
Italiana
Sostenibile]

FONDO EUROPEO AGRICOLO PER LO SVILUPPO RURALE: L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI

Programma di Sviluppo Rurale Nazionale 2014/2020 - Sottomisura 10.2

SUIS.2 – SUINICOLTURA ITALIANA SOSTENIBILE.2

PROGETTO COFINANZIATO DAL FEASR - CUP: J89J21000970005

10. Chemes HE, Olmedo SB, Carrere C, Oses R, Carizza C, Leisner M, et al. Ultrastructural Pathology of the Sperm Flagellum: Association Between Flagellar Pathology and Fertility Prognosis in Severely Asthenozoospermic Men. *J Urol.* 1999;161: 1725–1725. doi:10.1016/S0022-5347(05)69031-3
11. Holt WV. Epididymal origin of a coiled-tail sperm defect in a boar. *J Reprod Fertil.* 1982;64: 485–489. doi:10.1530/jrf.0.0640485
12. Sironen A, Thomsen B, Andersson M, Ahola V, Vilkki J. An intronic insertion in KPL2 results in aberrant splicing and causes the immotile short-tail sperm defect in the pig. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103: 5006–5011. doi:10.1073/pnas.0506318103
13. Lovercamp KW, Safranski TJ, Fischer KA, Manandhar G, Sutovsky M, Herring W, et al. High resolution light microscopic evaluation of boar semen quality sperm cytoplasmic droplet retention in relationship with boar fertility parameters. *Arch Androl.* 2007;53: 219–228. doi:10.1080/01485010701426463
14. Tejerina F, Buranaamnuay K, Saravia F, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. *Theriogenology.* 2008;69: 1129–1138. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.01.027
15. Menkeld et al, 1990
16. WHO <https://www.who.int/>
17. Brito LFC, Althouse GC, Aurich C, Chenoweth PJ, Eilts BE, Love CC, et al. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology.* 2016;85: 1507–1527. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.01.002

Responsabile dell'informazione:



Autorità di Gestione:

mipaaf

ministero delle
politiche agricole
alimentari e forestali