

STANDARDIZING SEMEN CRYOPRESERVATION PROTOCOL IN RABBIT: IMPACT OF SPERM CONCENTRATION ON *IN VITRO* QUALITY AND REPRODUCTIVE PERFORMANCES

Michele Di Iorio, Fabrizio Lauriola, Emanuele Antenucci, Giusy Rusco, Marsia Miranda, Michele Schiavitto, Giovanni Bramante, Nicolaia Iaffaldano



15 Aprile 2024, Napoli



L'IMPORTANZA DELLA
CRIOCONSERVAZIONE
DEL SEME NEL SETTORE
CUNICOLO

Utile per le pratiche di
Inseminazione Artificiale
(AI)

Per preservare le risorse
genetiche maschili mediante
la creazione di **Criobanche**



PERDITA DI BIODIVERSITA'



Popolazioni di razze cunicole autoctone



Erosione della variabilità genetica



Animali meno flessibili nelle loro risposte ad improvvise variazioni climatiche ed ambientali

Secondo le linee guida della FAO (FAO, 2007), la maggior parte delle razze di coniglio è stata inclusa nei programmi nazionali di conservazione delle risorse genetiche.



associazione nazionale conicoltori italiani
LE RAZZE DEL REGISTRO ANAGRAFICO



CRIOBANCA DEL SEME

Sostenibilità nel settore cunicolo



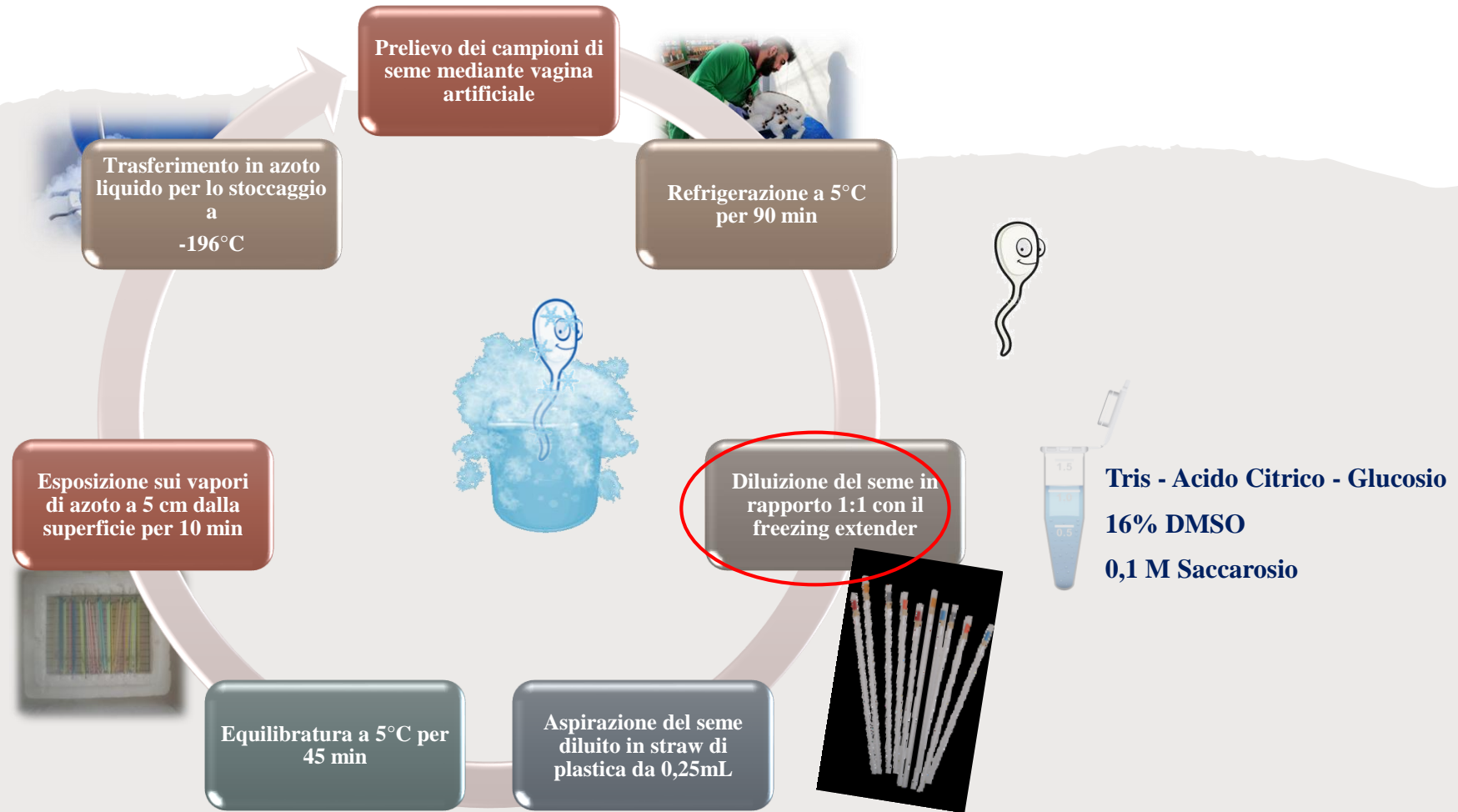
Salvaguardia delle risorse genetiche

Elevata Variabilità Genetica



Adattabilità delle popolazioni

PROTOCOLLO DI CRIOCONSERVAZIONE



Attualmente, il protocollo è basato sulla diluizione del seme con il freezing extender ad un rapporto fisso di 1:1. Ciò implica un'alta variabilità del numero di spermatozoi all'interno di ogni straw.



OBIETTIVO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'influenza di **diverse concentrazioni spermatiche** sulla **qualità *in vitro*** e sulle **prestazioni riproduttive** del seme di coniglio crioconservato.

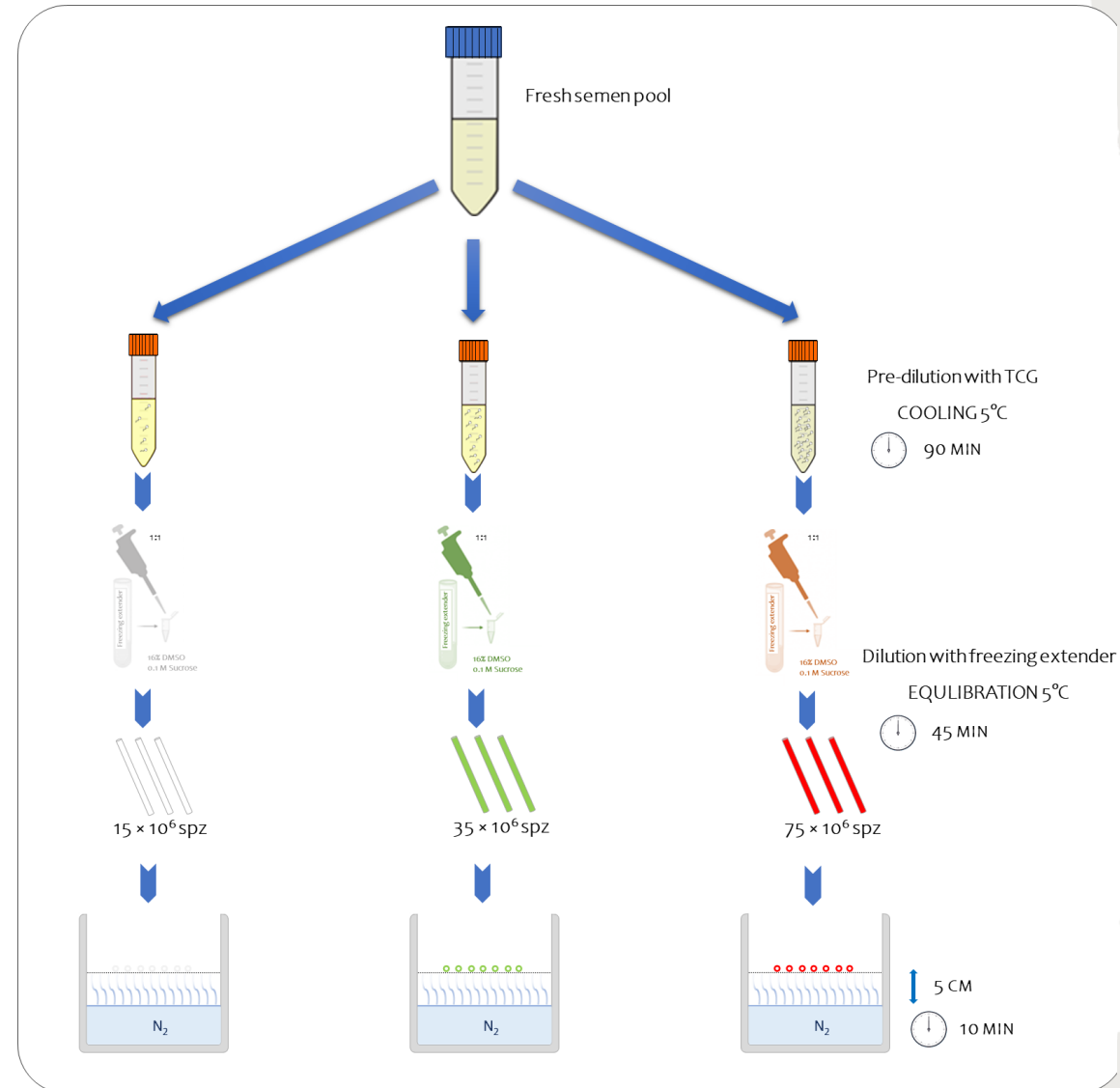


DISEGNO SPERIMENTALE

Animali e prelievo del seme



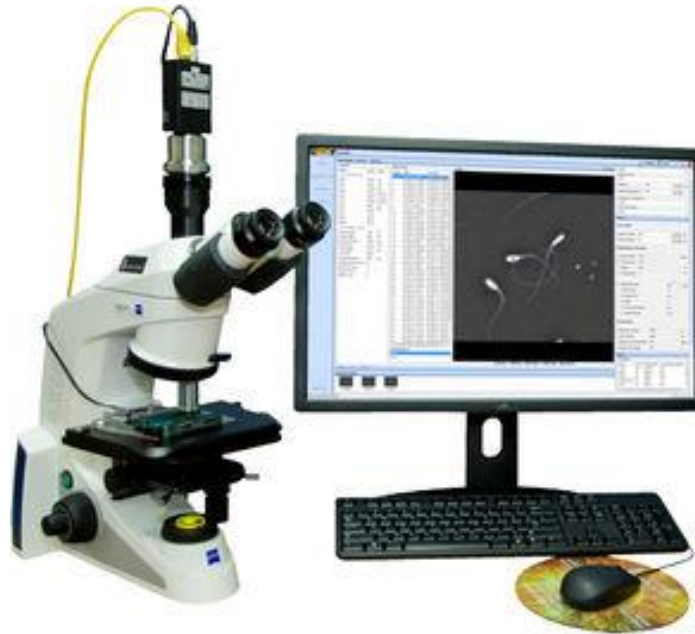
Procedimento



VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE QUALITATIVE *IN VITRO*

La **qualità** del seme, include:

- **TM (%)**, motilità totale;
- **PM (%)**, motilità progressiva;
- **VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)**, velocità curvilinea;
- **VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$)**, velocità rettilinea;
- **VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$)**, velocità media del percorso;
- **SMI (%)**, integrità della membrana spermatica.



Motilità spermatica
CASA system



Integrità della membrana spermatica
Muse® Cell Analyzer

E' stata valutata nel **seme fresco**
diluito, dopo l'equilibratura e dopo lo
scongelo.

2° DISEGNO SPERIMENTALE



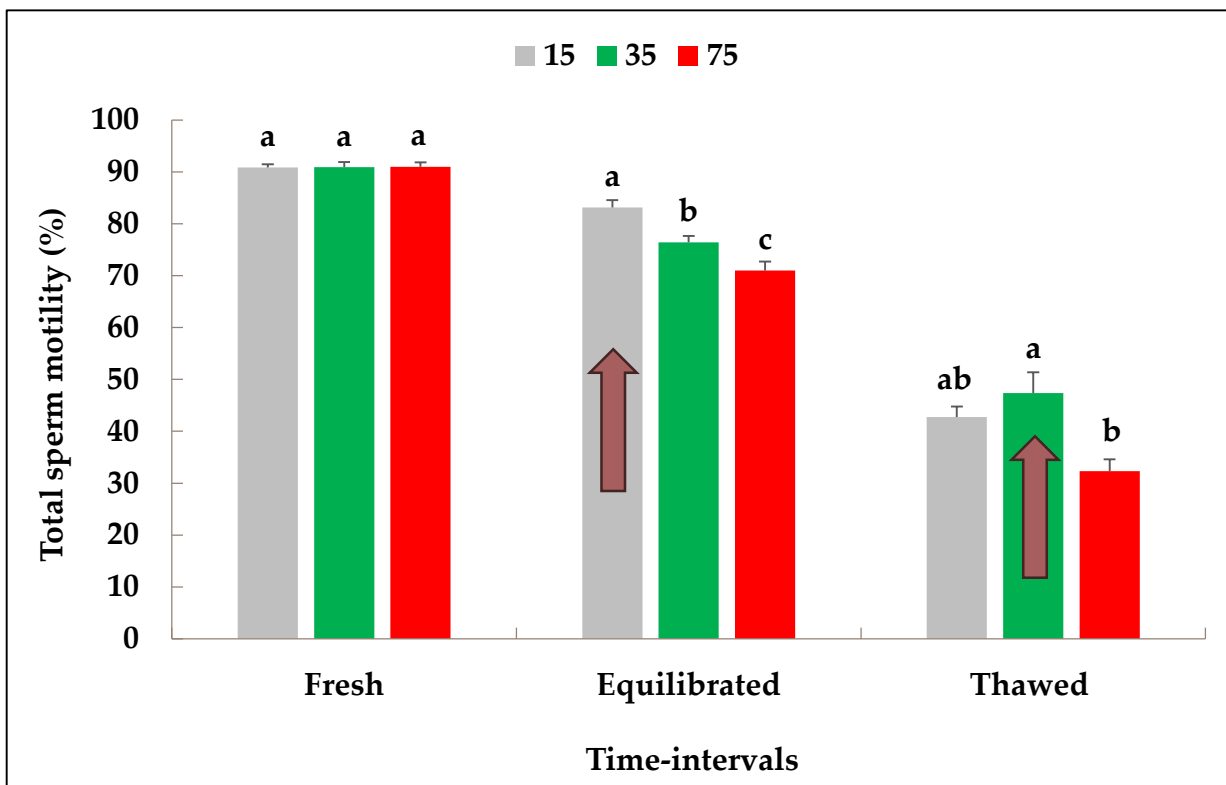
Quattro gruppi da 20 fattrici ciascuno sono stati inseminati con **seme fresco** e **congelato** (utilizzando le tre concentrazioni spermatiche/straw), rispettivamente.



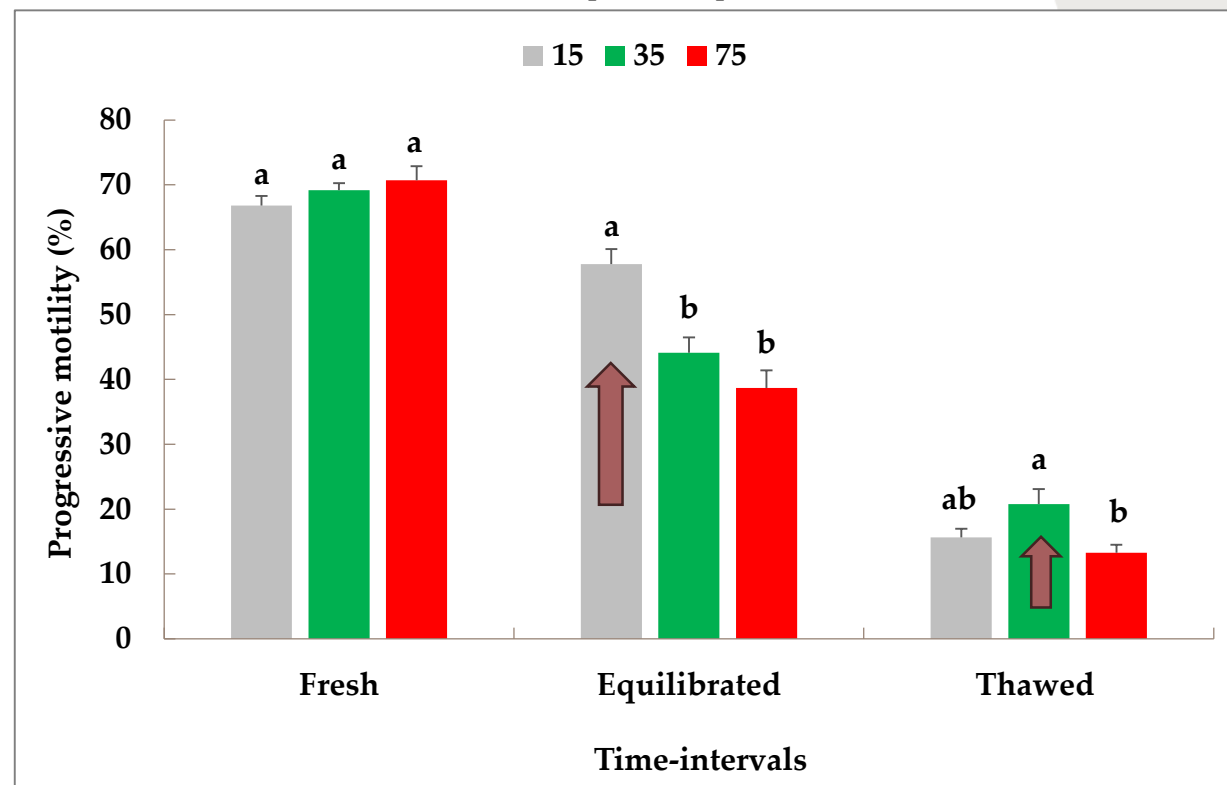
- I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica della varianza **ANOVA** utilizzando il software **SPSS**.
- Test di comparazione **SCHEFFE**.
- La significatività è stata settata a $P < 0.05$.

RISULTATI *IN VITRO*

Effetto di differenti concentrazioni spermatiche per straw sulla **motilità totale (TM)** del seme cunicolo durante diversi intervalli temporali del processo di crioconservazione.



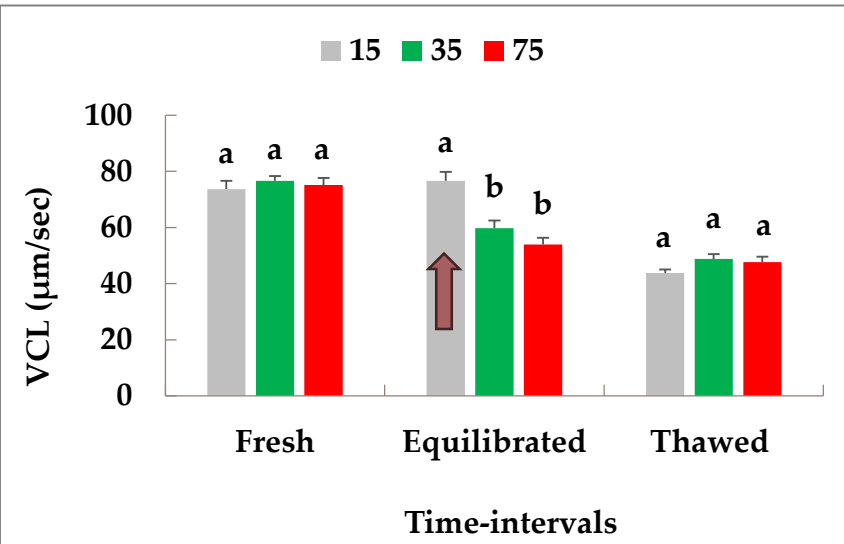
Effetto di differenti concentrazioni spermatiche per straw sulla **motilità progressiva (PM)** del seme cunicolo durante diversi intervalli temporali del processo di crioconservazione.



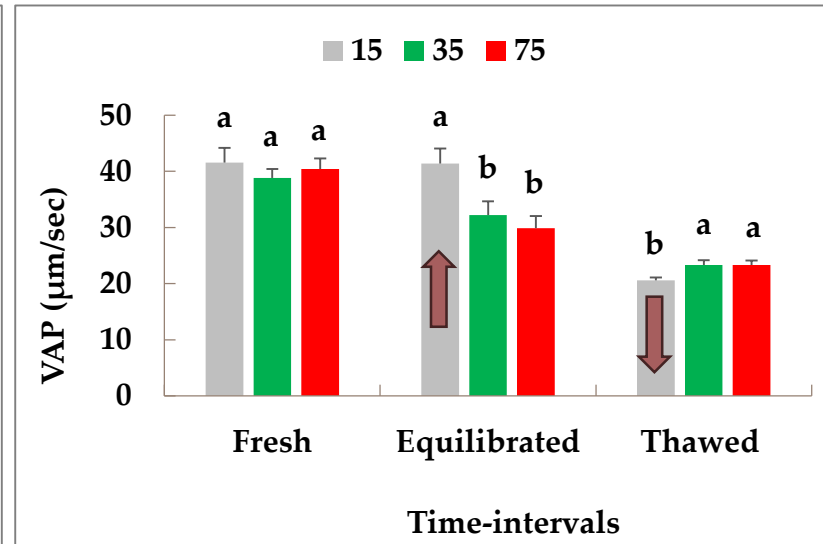
Le diverse lettere minuscole (a-c) indicano significatività statistica a $p < 0.05$ tra le **diverse concentrazioni di spermatozoi in ciascun intervallo di tempo**. Le concentrazioni di spermatozoi (15, 35 e 75) sono espresse come n° spz × 10⁶/straw.

RISULTATI

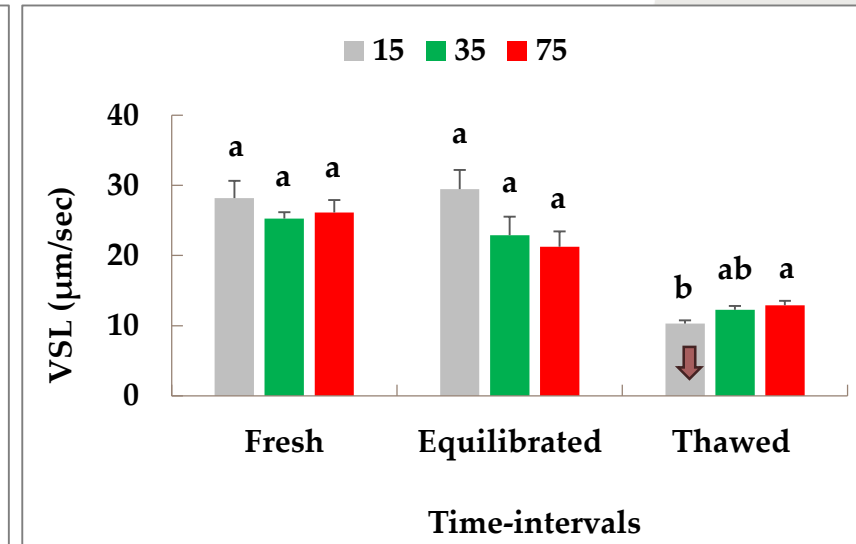
Effetto di differenti concentrazioni spermatiche per straw sulla **velocità curvilinea (VCL)** del seme cunicolo durante diversi intervalli temporali del processo di crioconservazione.



Effetto di differenti concentrazioni spermatiche per straw sulla **velocità media del percorso (VAP)** del seme cunicolo durante diversi intervalli temporali del processo di crioconservazione.



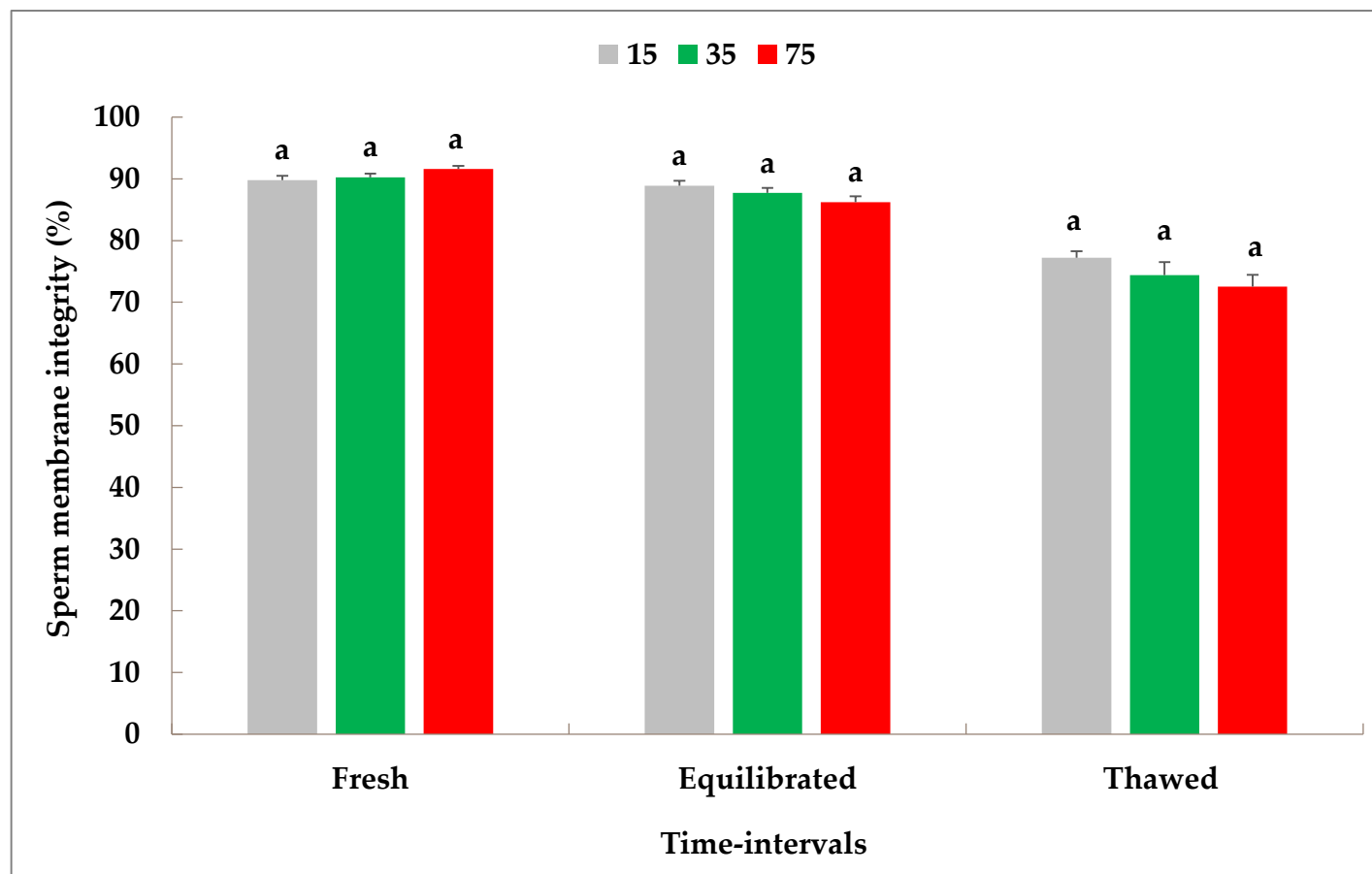
Effetto di differenti concentrazioni spermatiche per straw sulla **velocità rettilinea (VSL)** del seme cunicolo durante diversi intervalli temporali del processo di crioconservazione.



Le diverse lettere minuscole (a-b) indicano significatività statistica a $p < 0.05$ tra le diverse concentrazioni di spermatozoi in ciascun intervallo di tempo. Le concentrazioni di spermatozoi (15, 35 e 75) sono espresse come $n^{\circ} \text{ spz} \times 10^6 / \text{straw}$.

RISULTATI

Effetto di differenti concentrazioni spermatiche per straw sull' **integrità della membrana (SMI)** del seme cunicolo durante diversi intervalli temporali del processo di crioconservazione.



La sola lettera minuscola (a) indica che non c'è significatività statistica a $p < 0.05$ tra le diverse concentrazioni di spermatozoi in ciascun intervallo di tempo. Le concentrazioni di spermatozoi (15, 35 e 75) sono espresse come n° spz×10⁶/straw.

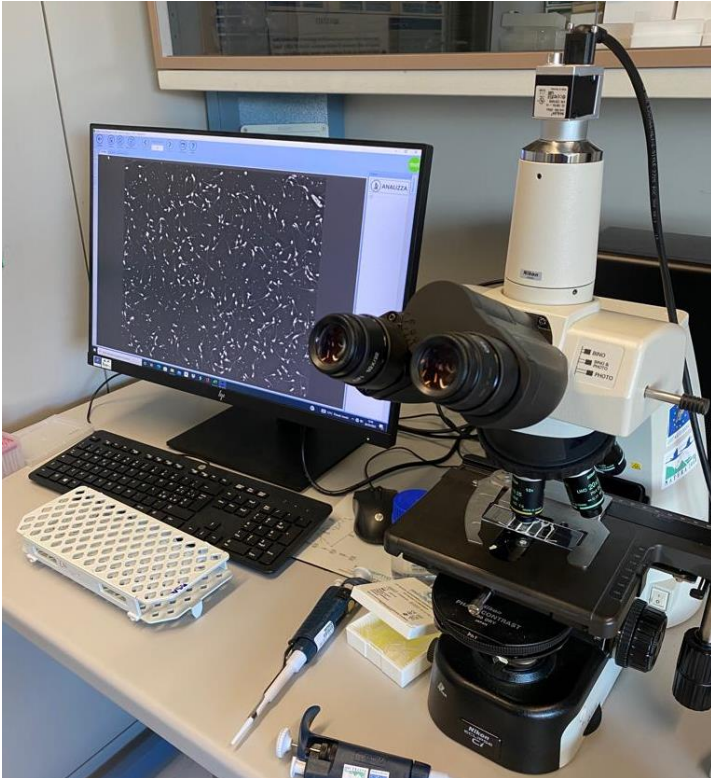
RISULTATI *IN VIVO*

Performance riproduttive ottenute dopo l'inseminazione di coniglie fattrici con seme fresco o congelato a differenti concentrazioni/straw.

Trattamento	% Fertilità (n)	% Parti (n)	Nati totali (media \pm SEM)	Nati vivi (media \pm SEM)
Fresco	85.0 (17)	80.0 (16)	9.8 \pm 0.5	9.5 \pm 0.5
Congelato (n° spermatozoi/straw)				
15 \times 10 ⁶	60.0 (12)	50.0 (10)	9.4 \pm 1.1	9.0 \pm 1.0
35 \times 10 ⁶	80.0 (16)	70.0 (14)	8.6 \pm 0.7	8.1 \pm 0.7
75 \times 10 ⁶	60.0 (12)	55.0 (11)	7.5 \pm 0.8	7.4 \pm 0.8

Ogni gruppo è composto da 20 fattrici.

DISCUSSIONE



- L'effetto della concentrazione spermatica sul **seme fresco** è stato limitato.
- Il seme sottoposto ad **equilibratura** ad una concentrazione finale di 15×10^6 di spermatozoi per straw ha mostrato valori di motilità più elevati.
- Un'interpretazione plausibile di questo risultato è che gli spermatozoi avessero un'elevata **disponibilità di substrati energetici** durante l'equilibratura, grazie a un **maggiore rapporto diluente-spermatozoi**.
- Questo miglioramento non è stato mantenuto **dopo lo scongelamento**.
- La concentrazione più bassa sembra promuovere, durante il congelamento, la formazione di un maggior numero di **cristalli di ghiaccio** nell'ambiente extracellulare, compromettendo la qualità post-scongelamento.



DISCUSSIONE



Dopo lo scongelamento, è stato osservato che la TM e la PM sono risultate più elevate nella concentrazione di 35×10^6 , al contrario la concentrazione di 75×10^6 ha mostrato i valori peggiori di questi parametri.



I nostri risultati sono in linea con quelli di **altre** ricerche condotte in varie **specie**, in cui concentrazioni più elevate di sperma nelle straw sono state collegate a una diminuzione consistente delle percentuali di spermatozoi totalmente e progressivamente motili. (Contri et al., 2012; Peña et al., 2000; D'Alessandro et al., 2001)



Una **minore quantità di crioprotettori** disponibili per cellula può comportare una minore capacità crioprotettiva.



I risultati ***in vivo*** rispecchiano quanto osservato *in vitro*, dato che le % di fertilità e di parti più elevate si sono osservate sulle fattrici inseminate con le concentrazioni di 35×10^6 .

CONCLUSIONI

- La **concentrazione di spermatozoi per straw** gioca un ruolo fondamentale nella crioconservazione del seme di coniglio e influisce principalmente sulla qualità *in vitro*.
- Dai risultati ottenuti sia *in vitro* che *in vivo* possiamo affermare che la concentrazione di 35×10^6 per dose è risultata essere quella più efficace.
- Questi risultati offrono indicazioni preziose per perfezionare l'attuale **protocollo di congelamento** del seme di coniglio.
- La **standardizzazione** della concentrazione di spermatozoi in ciascuna straw è essenziale per ridurre al minimo la variabilità dei risultati e determinare con precisione il **numero di spermatozoi ricevuti da ciascuna fattrice** durante le procedure di IA.





GRAZIE A TUTTI PER L'ATTENZIONE