



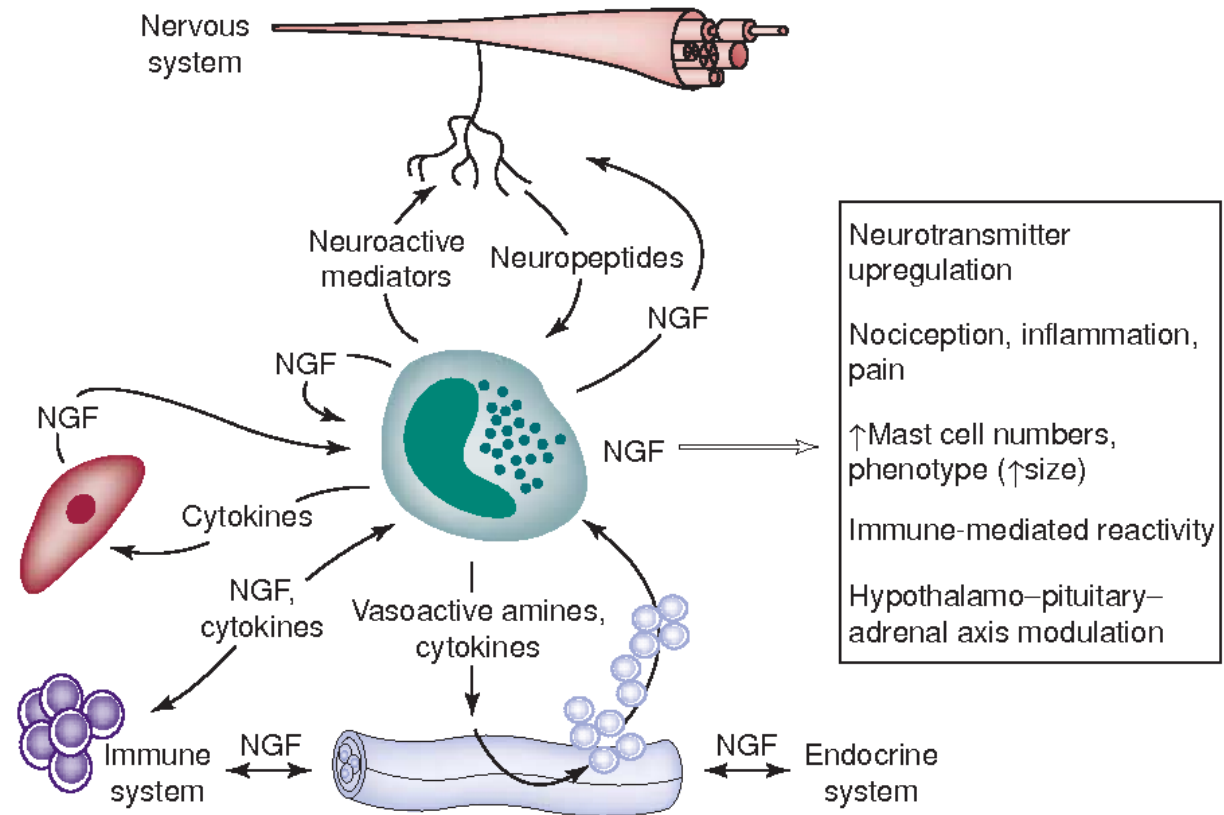
**EFFETTO DI NGF RICOMBINANTE (RRBNGF)  
INCAPSULATO CON CHITOSANO SULLE  
CARATTERISTICHE IN VITRO DEL SEME DI CONIGLIO**

Luigia Bosa, Cesare Castellini, Pilar García Rebollar, Sivia Gimeno Martos



# Nerve growth factor (NGF)

- Proteina solubile
- Famiglia delle neurotrofine
- Ruolo nell'apparato riproduttivo maschile e femminile



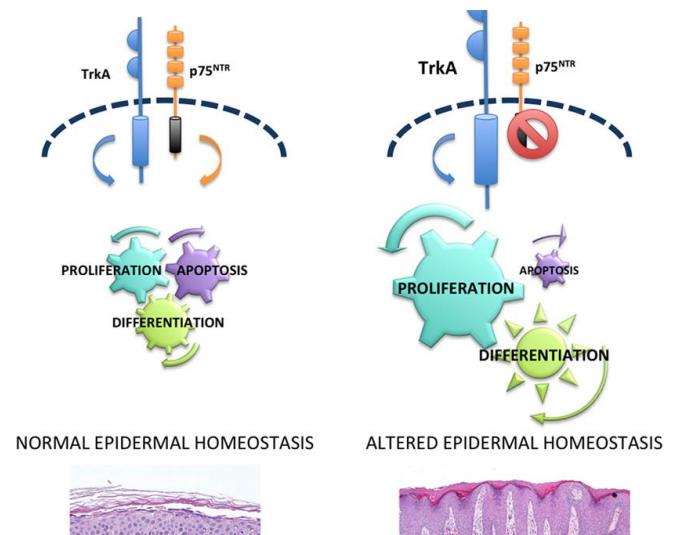
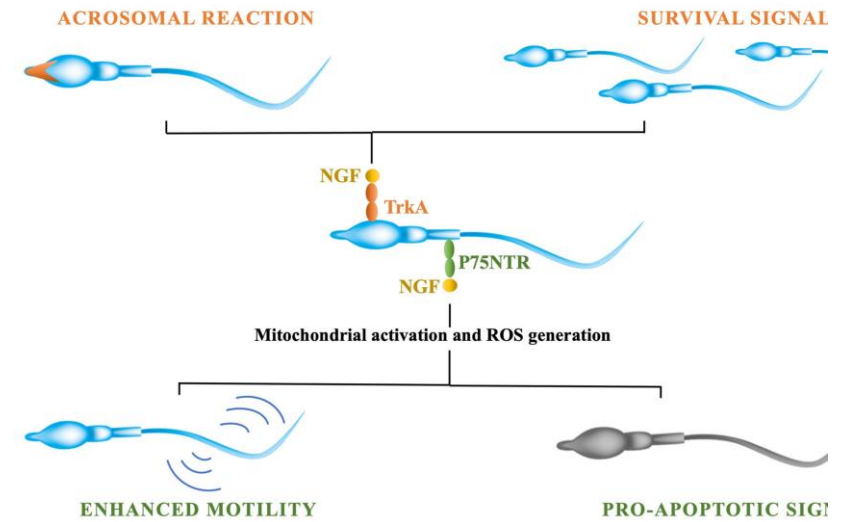
# NGF e Recettori:

- TrKA ( Tropomiosina Chinasi A) ad alta affinità
- p75NTR a bassa affinità

- **βNGF è presente:**

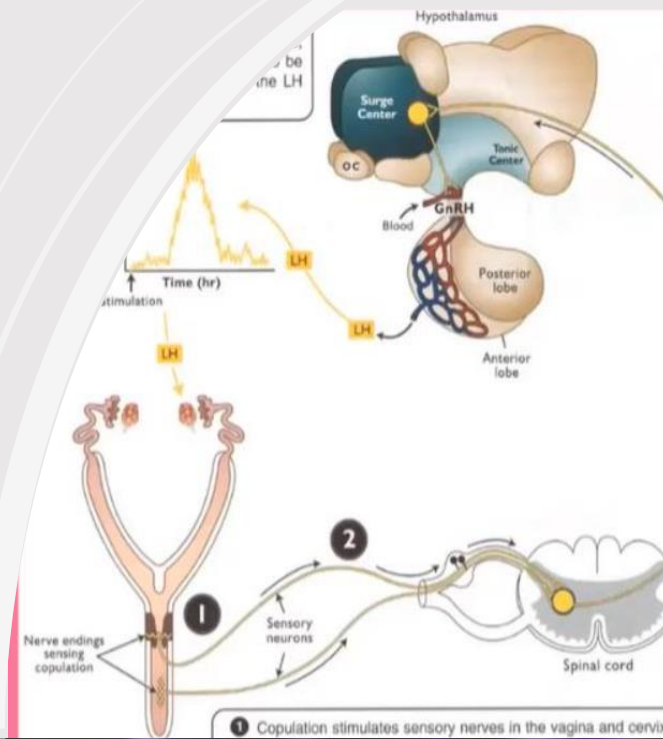
- Prostata
- Plasma seminale
- Epididimo
- Spermatozoi

*influenza la cinetica e altri parametri seminali*



## Fattore di crescita nervoso $\beta$ -NGF

- Quantità di NGF nel plasma seminale: **1- 2.2  $\mu$ g**
- Influisce sull'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio femminile
- In vitro migliora la motilità, vitalità e reazione acrosomiale degli spermatozoi



## Nuove strategie:

NGF → metodo di induzione dell'ovulazione nelle coniglie

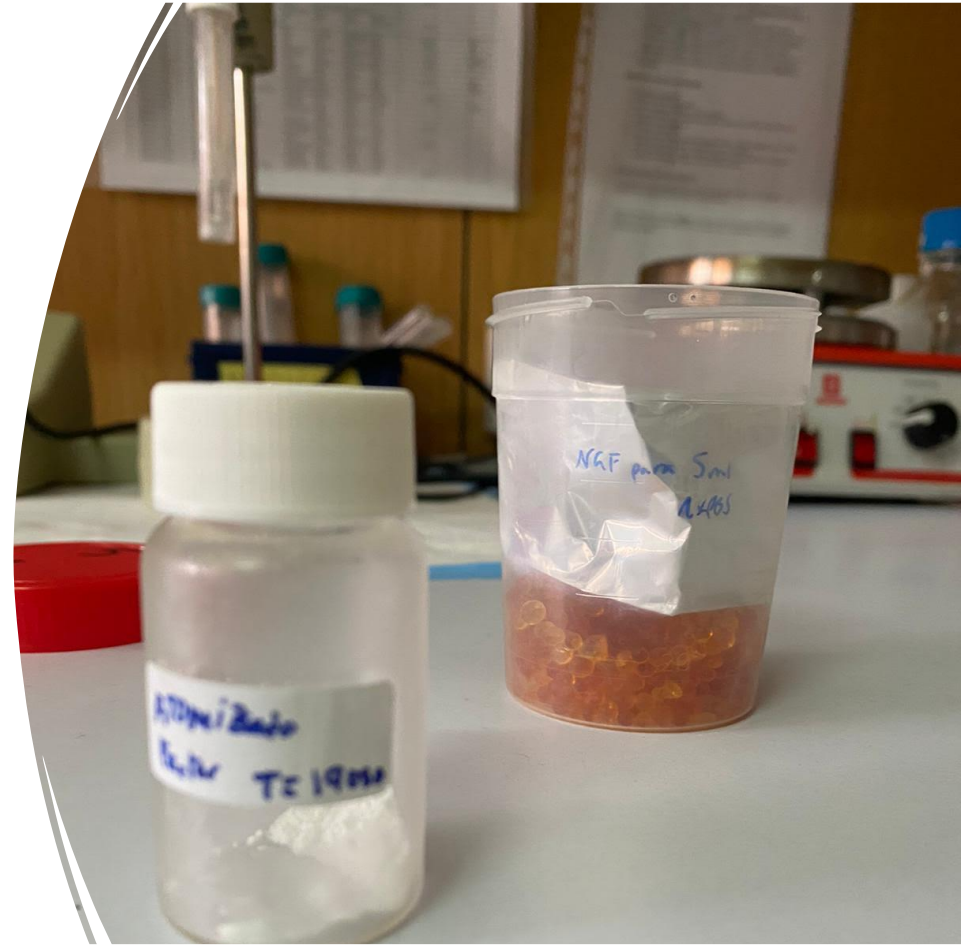
- rrbNGF : rapido assorbimento
- Plasma seminale → Aminoproteasi
- **Soluzione** : Modulatore di rilascio che funzioni e non danneggi gli spermatozoi



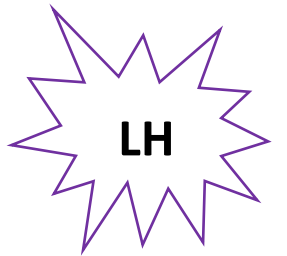
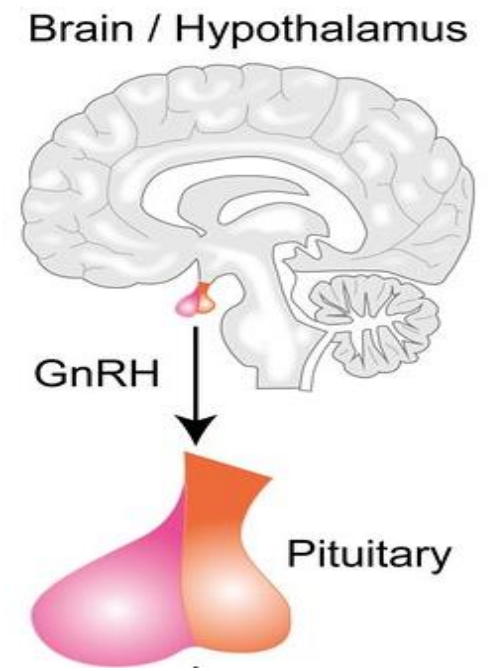
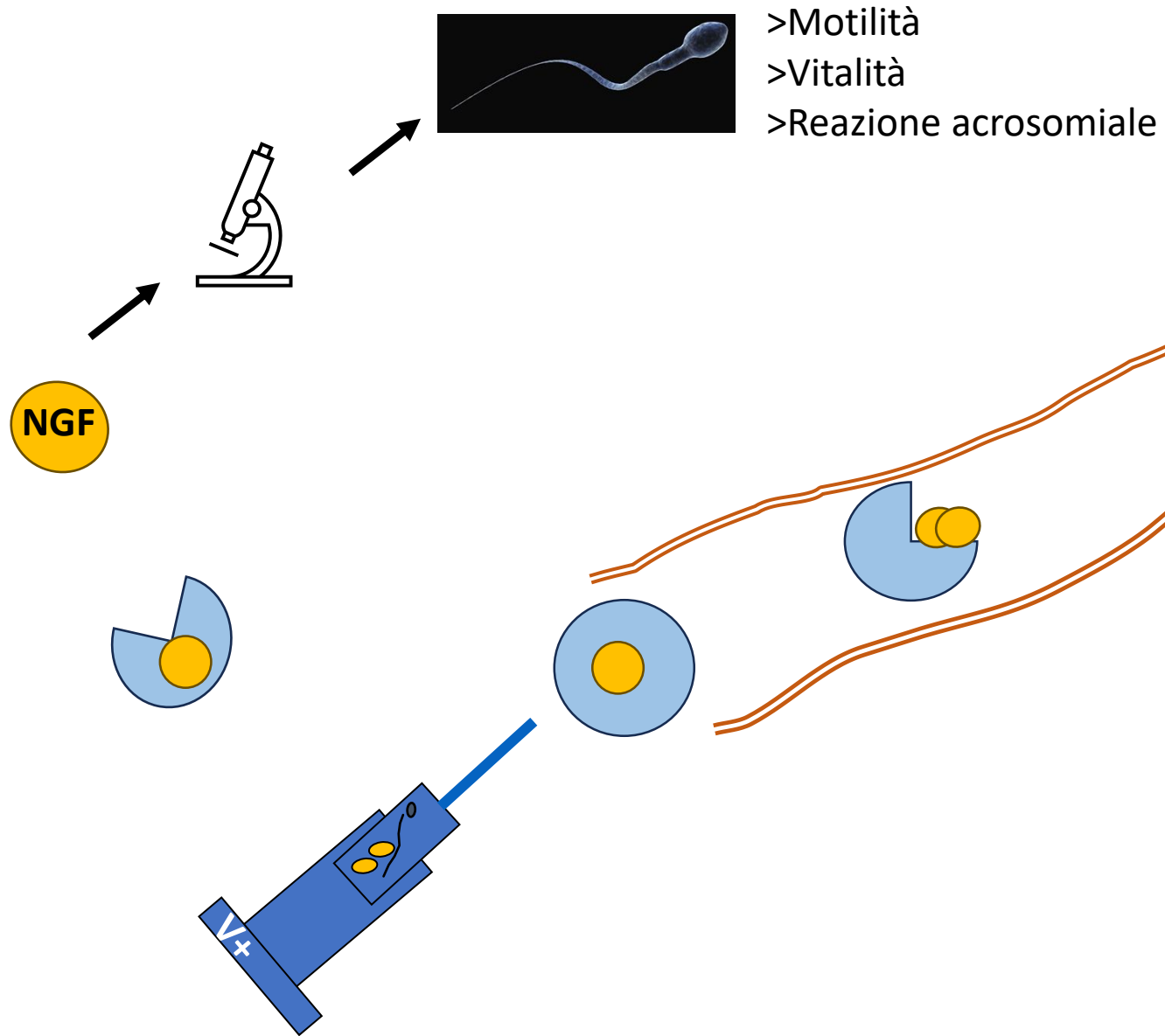
# Obiettivo della ricerca

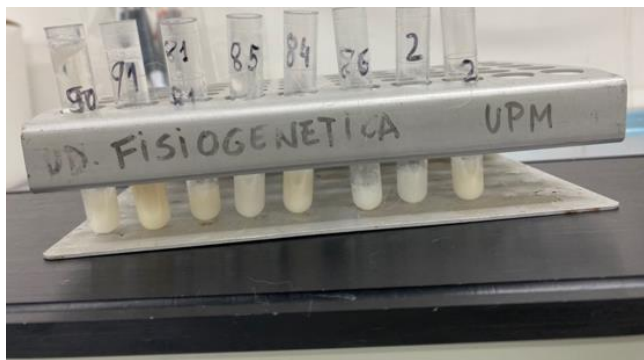
---

- Analizzare in vitro l'effetto dell'aggiunta di rr $\beta$ NGF microincapsulato in **chitosano** nella dose seminale
- Impatto sui parametri di qualità del seme (concentrazione, vitalità, motilità)
- Stato di capacitazione







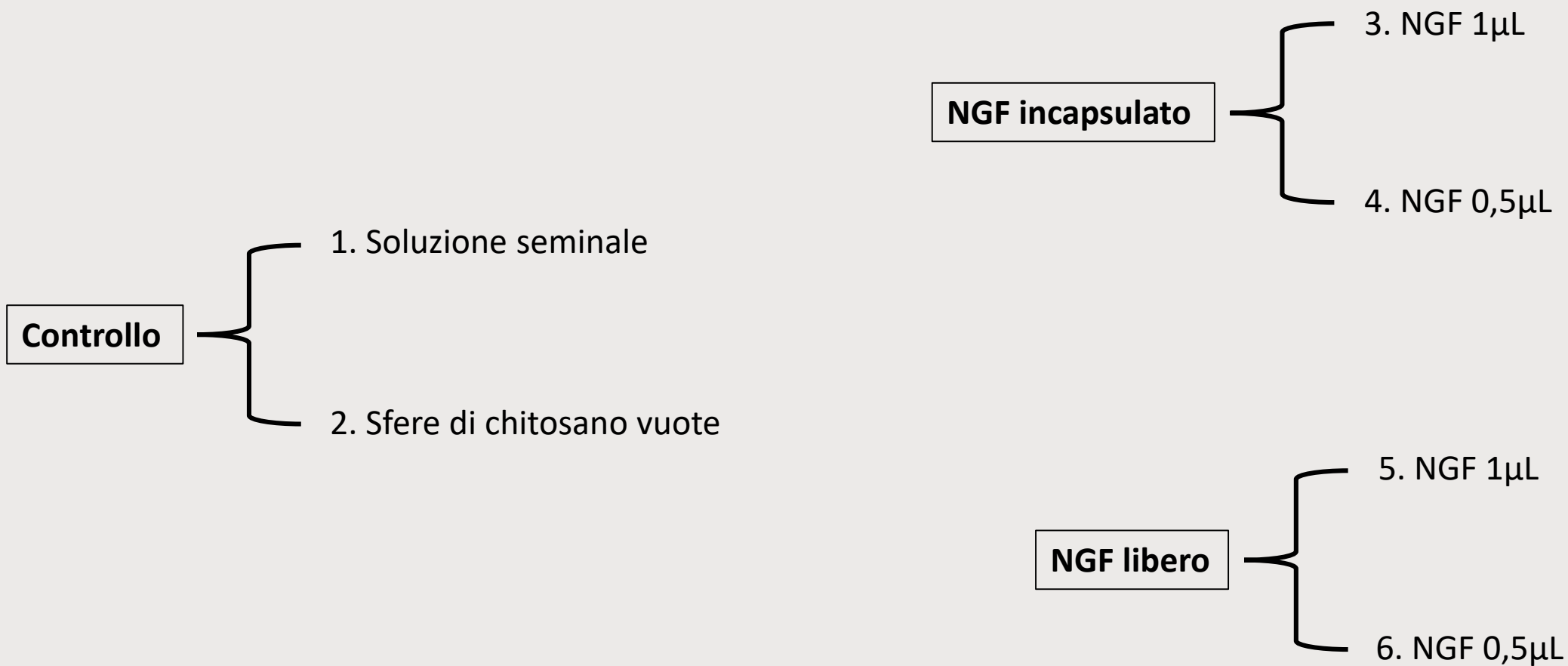


# Materiali e metodi

- **Universidad Politecnica de Madrid (UPM, Spagna)**
  - Conigli adulti New Zeland White x California
  - 15 prelievi seminali in 2 mesi mediante vagina artificiale (37°C)
- Analisi delle caratteristiche del seme dopo l'aggiunta di microcapsule vuote nel tempo (0, 1h, 2h)
  - Camera Neubauer
  - Seme di 3 maschi adulti → Pool seminale

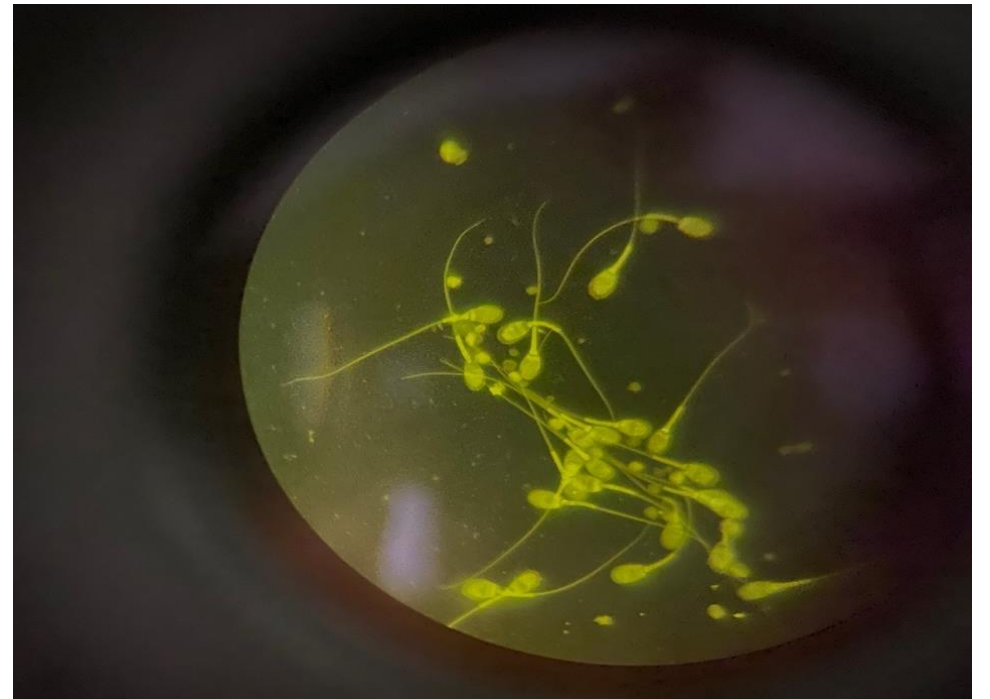
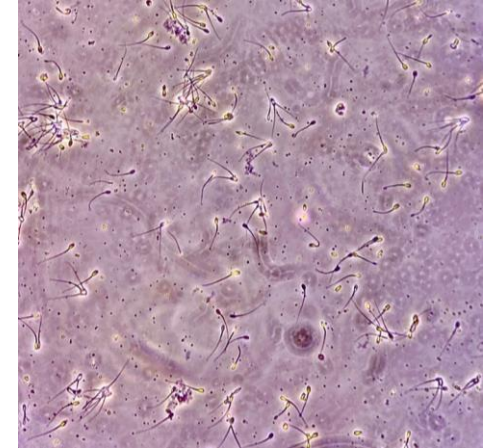
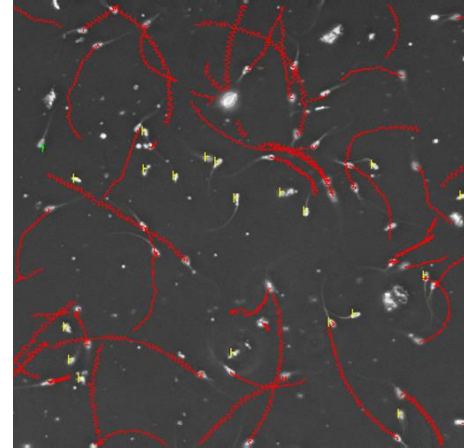


• Sei gruppi sperimentali :



# Analisi qualitativa

- **Vitalità** → colorazione eosina-nigrosina
  - Rosa/lilla: morti
  - Non colorati : vivi
- **Motilità** → CASA (Analisi spermatica assistita da computer), 5 video per ogni trattamento 0h,1h,2h.
  - Velocità curvilinea (VCL)
  - Velocità su traiettoria lineare (VSL)
  - Linearità (LIN)
  - Ampiezza dello spostamento laterale della testa (ALH)
- **Cellule vive, capacitate e reagite** → CTC ( clorotetraciclina) microscopio Leica
  - **NC:** fluorescenza sulla testa
  - **C:** fluorescenza acrosoma
  - **RA:** no fluorescenza sulla testa o banda equatoriale luminosa



# Risultati e discussione

---

PARAMETRO	Trattamento	Tempo	Interazione (Tempo x Tratt.)
Non Capacitati (NC)	0.0002	<.0001	0.2983
Capacitati (CP)	0.1597	<.0001	0.1813
Reagiti (AR)	<.0001	<.0001	0.4860
CP/NC	0.0055	<.0001	0.2994
AR/CP	0.0002	0.0401	0.3567
Viabilità	0.4865	0.9631	0.9999
Motilità non progressiva	0.5828	0.1882	0.8028
Motilità progressiva	0.0043	<.0001	0.2763
Motilità totale	0.1757	0.0052	0.1563
VCL	0.2797	0.7763	0.4358
VSL	0.7746	0.4940	0.8882
VAP	0.6944	0.6215	0.9930
LIN	0.5372	0.3359	0.4216
STR	0.6605	0.1830	0.3706
WOB	0.4400	0.4957	0.4430
ALH	0.1526	0.0646	0.3173
BCF	0.7116	0.3406	0.4605

**Tabella 1: Significatività generale degli effetti**

# Effetto del trattamento

PARAMETRO	Trattamenti	LSMEAN
Non Capacitati (NC)	0.5 µL NGF I	75,48 a
	0.5 µL NGF L	72,33 a
	1 µL NGF I	71,00 a
	1 µL NGF L	72,26 a
	Controllo	80,83 b
	Controllo -	81,25 b
	Root MSE	7,16
Reagiti (AR)	0.5 µL NGF I	11,01 b
	0.5 µL NGF L	14,40 c
	1 µL NGF I	12,46 bc
	1 µL NGF L	12,27 bc
	Controllo	6,32 a
	Controllo -	5,90 a
	Root MSE	4,45
CP/NC	0.5 µL NGF I	19,30 b
	0.5 µL NGF L	21,37 b
	1 µL NGF I	24,30 c
	1 µL NGF L	24,41 c
	Controllo	16,90 a
	Controllo -	16,82 a
	Root MSE	8,27
AR/CP	0.5 µL NGF I	91,49 bc
	0.5 µL NGF L	98,90 cd
	1 µL NGF I	75,33 b
	1 µL NGF L	76,31 b
	Controllo	49,18 a
	Controllo -	43,91 a
	Root MSE	16,17
Motilità progressiva	0.5 µL NGF I	58,85 bc
	0.5 µL NGF L	64,30 c
	1 µL NGF I	51,59 ab
	1 µL NGF L	58,02 bc
	Controllo	59,22 bc
	Controllo -	50,95 a
	Root MSE	8,90
<b>legenda</b>	I=Chitosano incapsulato; L = Chitosano libero	

**Tabella 2. Effetto del trattamento su alcuni parametri seminali**

## Effetti NGF

- < **NC** rispetto al controllo
- > **RA**
- **CP/NC**

*Nessun effetto sulla motilità e cinetica degli spermatozoi*

## Effetti chitosano

- **MP > 6,72%**

Effetto tempo  
di  
conservazione

Parametro	Tempo (h)			Root MSE
	0	1	2	
Non Capacitati (NC)	83,24 c	75,44 b	67,90 a	7,16
Capacitati (CP)	10,82 a	14,64 b	18,43 c	4,61
Reagiti (AR)	6,10 a	10,51 b	14,57 c	4,45
CP/NC	13,00 a	19,91 b	28,14 b	8,27
AR/CP	65,38 a	70,79 ab	85,46 bc	16,17
Motilità progressiva	50,07 a	63,98 c	57,45 b	8,90
Motilità totale	50,07 a	88,88 b	86,42 b	8,83



*Inizialmente la vitalità e la motilità totale erano simili in tutti i gruppi*

**Conservazione del seme per 1h**

- ❖ > Motilità
- ❖ < Motilità (stress da diluizione, temperatura)

**Conservazione del seme per 2h**

- ❖ > n° C e RA
- ❖ < Motilità

**L'uso di microcapsule di chitosano , vuote o con NGF**

- ❖ = Vitalità cellulare
- ❖ < MP

# Conclusioni

Possiamo quindi affermare che :

**NGF**

- ❖ < NC e > RA
- ❖ > dinamica di C e RA spz
- ❖ No effetti sui parametri cinetici

**CHITOSANO**

- ❖ < **Motilità**

*L'utilizzo di rrβNGF microincapsulato non ha sostanzialmente modificato i parametri di qualità del seme*



Grazie per l'attenzione!



# Microincapsulazione di rrβNGF

- Gelificazione ionotropica
- Microsfere dimensioni inferiori di 10 $\mu\text{m}$ ,
- Microsfere rr $\beta$ NGF liofilizzate e sfere di chitosano senza rr $\beta$ NGF risospese in soluzione PBS (filtrato e autoclavato )

