

Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie

TESI DI LAUREA IN “SCIENZE E TECNOLOGIE ANIMALI”

TITOLO

**SESSAGGIO DEL SEME BOVINO,
TECNICHE E PROSPETTIVE DI MERCATO**

Sexed bull semen, techniques and market perspectives

Relatore:

Chiar.mo Prof. *Antonio Mollo*

Laureanda:

Serena Mazza

Matricola n. 563525

ANNO ACCADEMICO 2008 - 2009

RIASSUNTO

Da sempre la possibilità di predeterminare il sesso del nascituro è stata un sogno per gli allevatori, soprattutto per coloro i quali possiedono aziende di bovine da latte, che potrebbero essere così in grado di programmare esattamente la quota di soggetti da adibire alla rimonta aziendale.

Questo inoltre permetterebbe di utilizzare gli animali rimanenti per fecondazioni con tori o con embrioni di razze da carne, diversificando, così, il business aziendale.

Per ottenere come risultato la separazione degli spermatozoi X da quelli Y, negli anni si sono susseguite diverse tecnologie più o meno efficienti, anche grazie alla scoperta dell'esatta differenza di contenuto di DNA tra gli spermatozoi maschili e quelli femminili.

Tra queste tecniche è possibile annoverare l'elettroforesi, l'utilizzo degli antigeni H-Y, procedimenti di centrifugazione con albumina o in gradiente di Percoll e filtrazione in colonne di Sephadex.

Queste procedure presentavano però dei limiti rilevanti, come la perdita di motilità degli spermatozoi, un livello di purezza del seme ottenuto non idoneo ad una fecondazione mirata e come ultimo aspetto, ma di sicuro non meno rilevante, una ridotta percentuale di concepimento!

Per raggiungere risultati sempre più convenienti sotto il profilo della purezza del seme e quindi anche sotto quello economico, si è cercato con il tempo di migliorare e perfezionare l'unica tecnica considerata ormai valida per il sessaggio del seme: la citofluorimetria a flusso.

Tale tecnica si avvale di sostanze fluorescenti che, legandosi agli spermatozoi, emettono più o meno fluorescenza a seconda del contenuto di DNA, ottenendo così una "luce" maggiore per gli spermatozoi X, essendo più grandi e con più DNA, e minore per quelli Y.

Di certo anche questo meccanismo presenta diverse limitazioni, come:

- ~ la lentezza della procedura;*
- ~ una minore concentrazione di spermatozoi presenti nel prodotto finale, a causa di una notevole perdita di quest'ultimi, perché non bene orientati per permettere la lettura della fluorescenza emessa;*
- ~ una minore capacità fecondante.*

Nonostante ciò, rispetto alle tecniche considerate ormai obsolete, la citofluorimetria a flusso permette una purezza del seme sessato di circa il 90%.

Per questo motivo viene considerata ad oggi la sola tecnica efficiente per il sessaggio.

Gli allevatori che decidono di utilizzare seme sessato, devono però osservare attentamente le procedure per la fecondazione ed alcune linee guida per ottenere il meglio dalla minore presenza di spermatozoi!

La disponibilità commerciale di sperma sessato congelato per i bovini rappresenta un'innovazione importante nella gestione della riproduzione in questa specie.

Le dosi di seme sessato hanno comunque tutt'ora un costo elevato, rispetto a quello convenzionale: è sicuramente questo il motivo per cui l'utilizzo di tale prodotto è ancora limitato.

Probabilmente, una più attenta valutazione del rapporto costi/benefici porterà ad un ben diverso sviluppo di questa interessante procedura.

ABSTRACT

From years the possibility of offspring sex pre-selection has been a dream for breeders, mainly for dairy farms' owners, with the aim to plan exactly the animals quota for the farm replacement.

Besides, in this way, there would be the opportunity to use the remaining animals for inseminations with beef cattle bulls or embryos, having, in this way, another income.

To obtain as result the separation between X- and Y- spermatozoa, during last years lot and different technologies were studied, also due the discovery of the exact difference of DNA content between male and female spermatozoa.

Between these technologies it's possible to mention electrophoresis, use of H-Y antigen, centrifugation with albumin columns or Percoll density gradient, and gel-filtration in Sephadex columns.

However these procedures had relevant limits, as the lost of spermatozoa motility, a semen purity level not suitable for a satisfactory insemination and, last but not least, a lower conception rate.

In order to reach the more convenient possible results, for semen purity and also from economical point of view, during years lot of efforts were done to improve the only technique today considered valid for sexing procedure: flow cytometry.

This technique uses fluorescent matters that, linked with spermatozoa, give more or less fluorescence in relation with DNA content, with more "light" for X-spermatozoa, as they are bigger with more DNA, and less for Y- one.

Actually, also this mechanism shows lot of limitations, as:

- ~ procedure slowness;*
- ~ less spermatozoa concentration in the final product, due an high loss of these, because not well oriented in order to show the fluorescence;*
- ~ less fertilizing capacity.*

Despite all above, as regards with all techniques to be considered up today obsolete, flow cytometry allows about 90% of sexed semen purity.

For this reason it is considered the only efficient procedure for sex pre-selection.

However, all breeders who decide to use sexed semen must strictly follow the insemination procedures and some guide lines in order to obtain the maximum result despite the less spermatozoa concentration.

The commercial availability of cryo-preserved sexed sperm for bovines represent a very important innovation in managing this species reproduction.

Unfortunately, sexed semen doses have still a very high cost in comparison to the conventional one: for sure this is the main reason why we still see a limited use of this product. Probably, a better evaluation of costs/benefits ratio will bring to a totally different development of this interesting procedure.

CAPITOLO 1

L'inseminazione artificiale, nelle varie specie zootecniche, ha ormai da qualche tempo soppiantato le tradizionali tecniche di monta naturale, occupando un ruolo fondamentale nella gestione della riproduzione.

In particolare, per i bovini, rappresenta il principale strumento operativo per la selezione.

La FA (fecondazione artificiale) viene eseguita solitamente con il seme congelato che, per tale specie, consente di ottenere risultati, in termini di fertilità, paragonabili a quelli del seme fresco, sempreché le procedure di congelamento/scongelo siano adeguate e che l'eiaculato disponibile sia di ottima qualità.

Con la fecondazione naturale, un toro può coprire mediamente 20 femmine al mese, per una carriera riproduttiva che può durare all'incirca 12 anni. Se tutte le fecondazioni dessero seguito a gravidanza, il toro potrebbe fornire nella sua vita circa 3.000 vitelli.

Con l'inseminazione artificiale, invece, i vitelli possibili potrebbero essere anche 200.000! Occorre però considerare che non tutte le fecondazioni vanno a buon fine dando origine a una gravidanza: l'esito positivo dipende, infatti, da una serie di fattori, come la qualità iniziale del seme, la sua idonea conservazione alle temperature previste, la sanità della femmina ricevente e l'esperienza dell'operatore. (V. Bracco e M. DeAcetis, 2002)

Parlare di qualità del seme non è, però, semplice: è necessario, infatti, individuare innanzitutto l'aspettativa del consumatore e poi identificare quei parametri che consentano di stimare quanto del prodotto finale sia in grado di soddisfare tale attesa.

Per l'allevatore l'obiettivo principale non può che essere la fertilità, mentre il parametro qualitativo seminale maggiormente correlato ad essa è il numero di spermatozoi progressivamente motili dopo scongelamento, valutazione che può essere determinata grazie a diverse analisi come la misura della concentrazione seminale, della motilità e della morfologia degli spermatozoi, e dell'integrità di membrana. (A. Galli et al., 2003)

Sin dall'avvento dell'inseminazione artificiale, sia gli allevatori sia i centri tori hanno sognato di poter pre-selezionare il sesso dei futuri nascituri, sia per le aziende di vacche da latte, che per quelle di bovini da carne.

Le prime cercando di ottenere un sessaggio del seme che fornisca prole femminile, poiché la predeterminazione del sesso consentirebbe all'allevatore di programmare esattamente la quota di soggetti da adibire alla rimonta aziendale, lasciando a disposizione gli animali rimanenti per fecondazioni con tori da carne o con embrioni di razze da carne, incrementando di conseguenza la produzione di animali da carne pregiati sul territorio; le seconde cercando invece di ottenere prole

prevalentemente maschile per sfruttare al meglio il minor ICA (indice di conversione alimentare), IPG (incremento ponderale giornaliero) e la resa al macello caratteristica dei soggetti maschili più che di quelli femminili. (M.L. Sandionigi e G. Praderio, 2001-2003)

Il sessaggio del materiale seminale risulta quindi molto importante dal punto di vista economico, poiché rappresenta una tecnica potenzialmente efficiente di pre-selezione del sesso i cui benefici possono riguardare gli allevatori interessati sia al latte che alla carne, potendo aumentare la pressione di selezione sulla linea femminile e potendo controllare e ridurre i difetti genetici legati al sesso. (A. Galli et al., 2003)

E' possibile inoltre formulare programmi per l'uso dello sperma sessato che siano efficienti sotto il profilo riproduttivo ed economico anche se il prodotto è costoso e le percentuali di gravidanza sono inferiori. Tali programmi prevedono di seguire alcune indicazioni operative come per esempio quella di soddisfare la quota di rimonta aziendale necessaria annualmente in un allevamento, come accennato in precedenza, fecondando con sperma sessato esclusivamente le manze, che forniscono percentuali di gravidanza accettabili. Naturalmente i tori da impiegare, oltre che per le caratteristiche genetiche, devono essere scelti sulla base della fertilità del loro sperma dopo il processo di sessaggio. (M.L. Sandionigi e G. Praderio, 2001-2003)

Dopo una storia molto lunga di tentativi senza successo per differenziare gli spermatozoi presenti in un eiaculato di toro, si riuscì finalmente a determinare l'esatto contenuto di DNA presente nei cromosomi, calcolando una differenza di circa 3,85% nel contenuto di DNA tra il cromosoma X e Y. (C. Bacchiocchi, 2009)

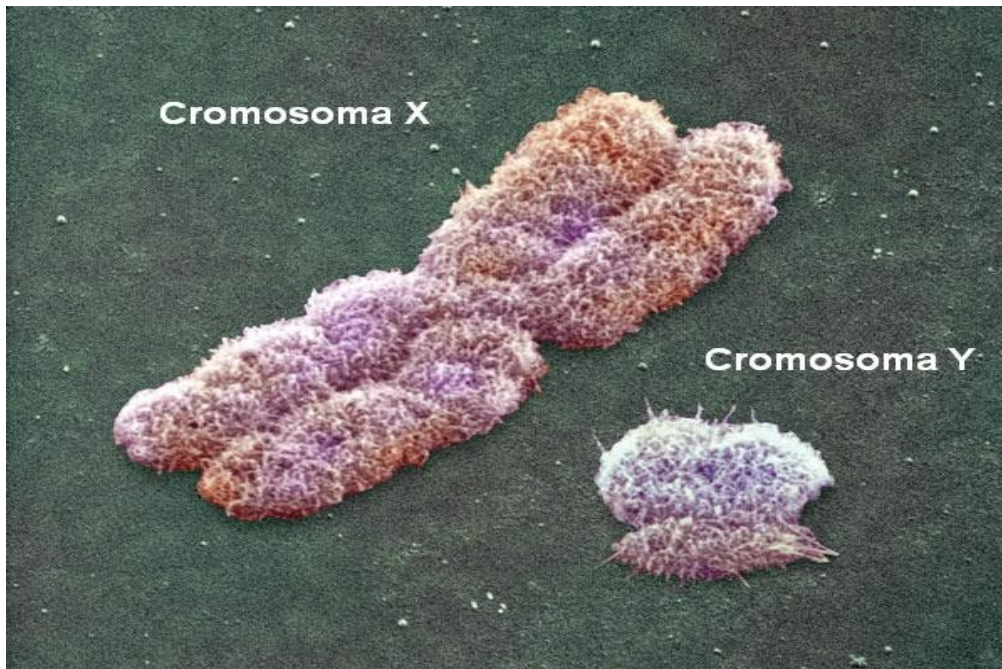
Nonostante queste misurazioni iniziali riducessero notevolmente la motilità degli spermatozoi, fino ad ucciderli definitivamente, portarono comunque ad ultimare sviluppi nel sistema di sessaggio del seme, che divenne in grado non solo di differenziare gli spermatozoi con cromosoma X da quelli con cromosoma Y, ma anche di selezionarli senza recare rilevanti danni cellulari. (D.L. Garner e G.E. Seidel Jr, 2008)

Numerose tecnologie si susseguirono per il raggiungimento di tale scopo, ma, attualmente, la citofluorimetria a flusso per separare i cromosomi X e Y è considerata la sola tecnica affidabile che è stata usata con successo per la commercializzazione di seme sessato. (A.C.J. Frijters et al., 2009)

Il seme bovino sessato congelato sta tuttora riscuotendo sempre maggior interesse in Italia come negli altri Paesi a zootecnia avanzata (Balduzzi, 2007).

A causa di fattori inerenti il processo di sessaggio e di crioconservazione dello sperma sottoposto alla separazione delle popolazioni spermatiche portatrici dell'uno o dell'altro cromosoma sessuale, il numero di nemaspermi presenti in una dose fecondante è notevolmente ridotto rispetto a quello mediamente contenuto in una dose di sperma non sessato.

Quest'aspetto da solo è già in grado di condizionare la fertilità di tale sperma, senza considerare eventuali alterazioni morfo – funzionali che possono avvenire durante i delicati processi che sottintendono alla normale capacità fecondante degli spermatozoi, quali reazione acrosomiale e metabolismo mitocondriale, che potrebbero venire alterati dal processo di sessaggio – congelamento. (M.L. Sandionigi e G. Praderio, 2001-2003)



In conclusione l'uso di seme sessato rappresenta al giorno d'oggi un metodo vantaggioso per ottenere un numero più elevato di femmine, consentendo di ampliare la mandria, vendere da vita le manze in esubero, risanare la stalla da malattie infettive eliminando gli animali portatori; per selezionare in linea femminile vitelle dalle migliori manze/vacche dell'allevamento, e fecondare le peggiori con seme di tori da carne. (www.intermizoo.it)

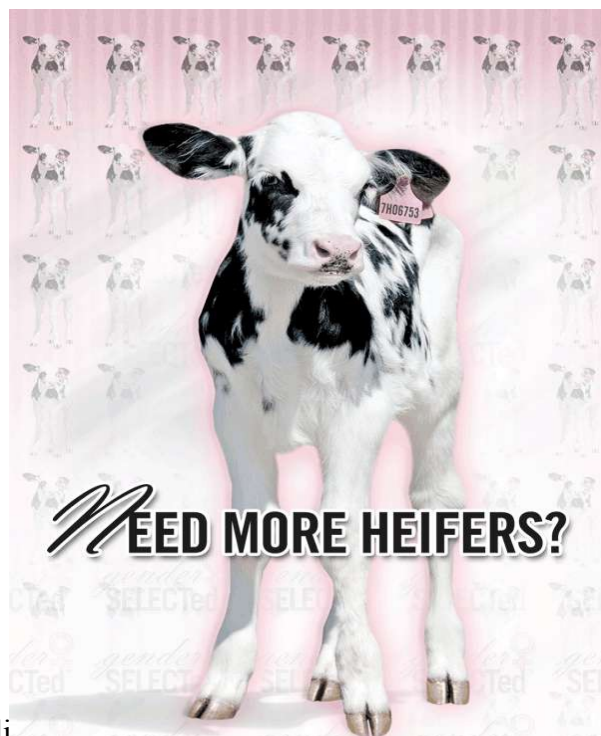
SESSAGGIO DEL SEME

Nelle specie animali, il dimorfismo sessuale è fortemente caratterizzato dallo stretto controllo di alcuni geni, che forniscono ai soggetti un corredo cromosomico che li distingue in due popolazioni, maschile e femminile.

Nei Mammiferi, i soggetti maschili possiedono un cromosoma X e un Y, mentre quelli femminili possiedono due cromosomi X. Dall' unione casuale di gameti maschili e femminili deriverà quindi una prole maschile e/o femminile.

La pre-selezione del sesso non può, infatti, prescindere dal meccanismo di determinazione dei sessi nei mammiferi legato alla presenza di due gonosomi (cromosomi sessuali): XX per la femmina e XY per il maschio. Dal momento che gli oociti dei mammiferi non possono che essere portatori del cromosoma X, sono gli spermatozoi le cellule determinanti il sesso dei nascituri, potendo portare un cromosoma X o Y.

La possibilità di dividere e selezionare il materiale seminale in base alla presenza di cromosomi sessuali diversi, procedimento indicato come sessaggio, porta, infatti, a benefici, per gli allevatori bovini, relativi alla programmazione delle nascite di vacche da rimonta aziendale o di tori da introdurre nei centri genetici. (A. Galli et al., 2003)



Nel tempo sono state utili le tecniche di selezione in questa specie bovina, con l'intento di ottenere un miglioramento genetico determinato da un'incensa e accurata selezione delle popolazioni. Questo miglioramento è ottenibile attraverso la valutazione dei caratteri ereditari, la variabilità genetica e l'intervallo generazionale, inteso come periodo compreso tra la nascita di un animale e la nascita della sua progenie.

Lo sviluppo di nuove tecniche, che passa dalle considerazioni teoriche, i test di laboratorio, fino all'utilizzo in campo, è sempre stato un processo lento e graduale. (M.L. Sandionigi e G. Praderio, 2001-2003)

Vecchie e nuove tecnologie, quindi, con un fine comune: la massima ottimizzazione economica del processo riproduttivo in campo bovino.

CAPITOLO 2

TECNICHE “IN DISUSO” DI SESSAGGIO DEL SEME

I principali metodi proposti in passato per il sessaggio dello sperma bovino sono stati i seguenti:

- 1- utilizzo degli antigeni H-Y (individuazione degli spermatozoi Y);
- 2- elettroforesi (spermatozoi Y all'anodo, spermatozoi X al catodo, con notevole perdita di motilità);

3- centrifugazione con albumina (separazione degli spermatozoi Y, con conseguente accumulo di questi nella parte più bassa della colonna) o in gradiente di Percoll (raccolta spermatozoi X nella parte più bassa della colonna);

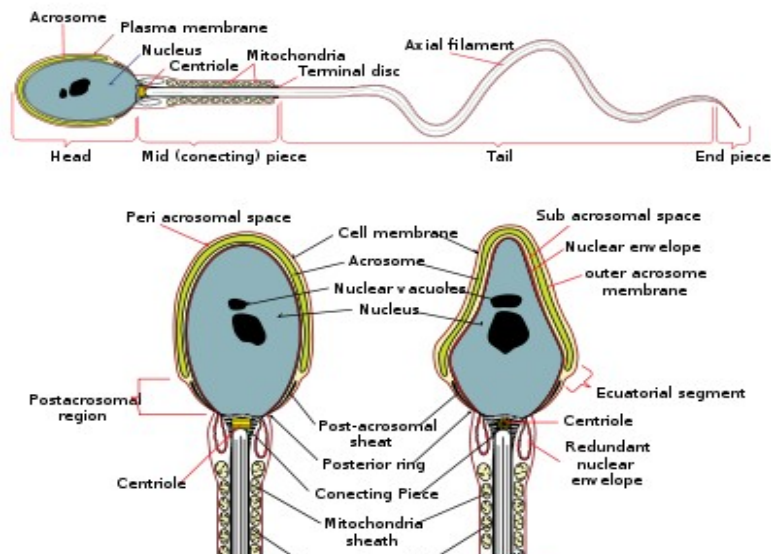
4- filtrazione in colonne di Sephadex (raccolta spermatozoi X, altamente mobili, nella prima frazione del filtrato). (A. Galli et al., 2003)

Queste tecniche però rappresentano molte limitazioni importanti, tra cui una ridotta percentuale di concepimento, che è di sicuro l'ostacolo principale.

Il sessaggio del seme è comunque una procedura particolarmente invasiva che impatta negativamente sulla vitalità dello sperma e sulla longevità, rispetto alla normale criopreservazione del seme.

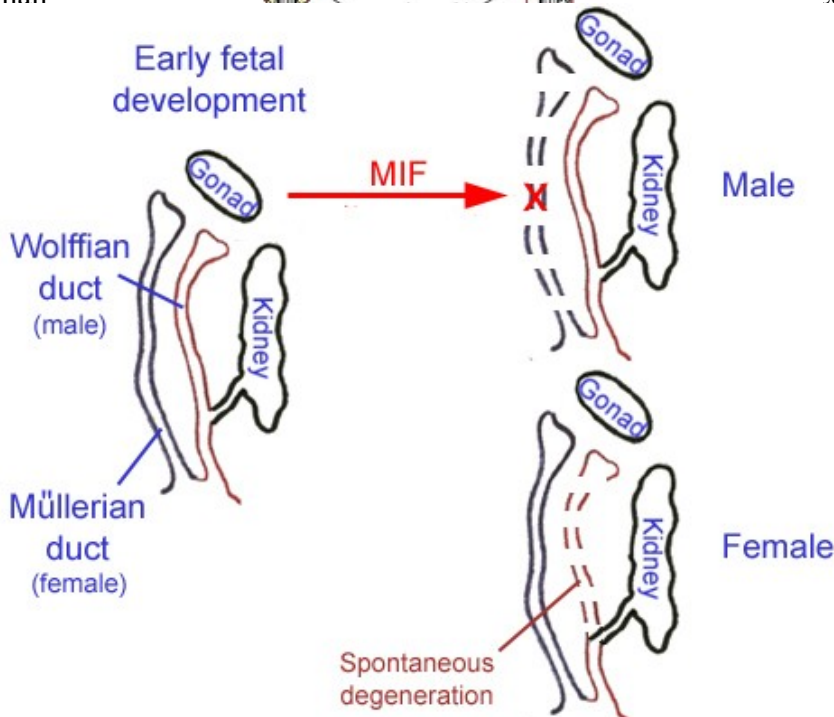
Antigeni H-Y

Gli spermatozoi sono completamente circondati da una membrana plasmatica, composta da un doppio strato fosfolipidico, attraversato da proteine e ricoperto da glicoproteine.



Varie proteine hanno un ruolo importante in un diverso individuo.

Fra le sostanze antigeniche di istogenesi sessuale maschile, l'antigene H-Y (A. Galli et al., 2003) è una delle più importanti. Una delle proprietà di questo antigene, che finisce per produrre



normale in un diverso

come un
 ciato al
 . Y. (A.
 di tale
 sticoli e

L'eventuale utilità dell' antigene H-Y deriva dal fatto che, utilizzando anticorpi marcati con opportuni coloranti, in modo tale da poterli individuare, sarebbe possibile determinare la frequenza di spermatozoi Y.

Dal punto di vista operativo però non sono stati ottenuti dei risultati soddisfacenti né nel settore analitico né in quello preparativo. (A. Galli et al., 2003)

Elettroforesi

L'elettroforesi è una tecnica analitica e separativa basata sul movimento di particelle elettricamente cariche immerse in un fluido. (www.wikipedia.it)

L'apparecchiatura è costituita da due parti: un alimentatore e una cella elettroforetica. L'alimentatore fornisce un flusso di corrente continua agli elettrodi applicati alla cella elettroforetica e pertanto i cationi migrano verso il catodo (-) e gli anioni verso l'anodo (+) a una velocità che dipende dall'equilibrio tra la forza di spinta del campo elettrico e le forze frenanti (frizionali ed elettrostatiche) esistenti tra ioni e mezzo circostante. (www.pacifici-net.it)

Tramite questa metodologia è possibile separare delle macromolecole, come DNA e proteine, in funzione della loro carica elettrica e del loro peso molecolare, utilizzando un forte campo elettrico ed un adeguato supporto lungo il quale far correre tali molecole, ad esempio gel di agarosio o di poliacrilamide. (A. Galli et al., 2003)

Le particelle si spostano quindi verso il catodo, se con carica positiva (cataforesi), o verso l'anodo, se con carica negativa (anaforesi).

La mobilità delle molecole nel gel varia secondo alcuni parametri: dimensione delle molecole, cariche, natura e concentrazione del mezzo elettroforetico, conformazione delle molecole e corrente applicata.

La mobilità elettrica, che esprime la tendenza di una specie chimica a muoversi in un campo elettrico applicato, può essere ricavata con l'equazione di Henry:

$$U_e = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot \zeta \cdot f(ka)}{3 \cdot \eta}$$

dove: U_e = mobilità elettroforetica

ε = costante dielettrica

ζ = potenziale zeta

$f(ka)$ = funzione di Henry

η = viscosità solvente

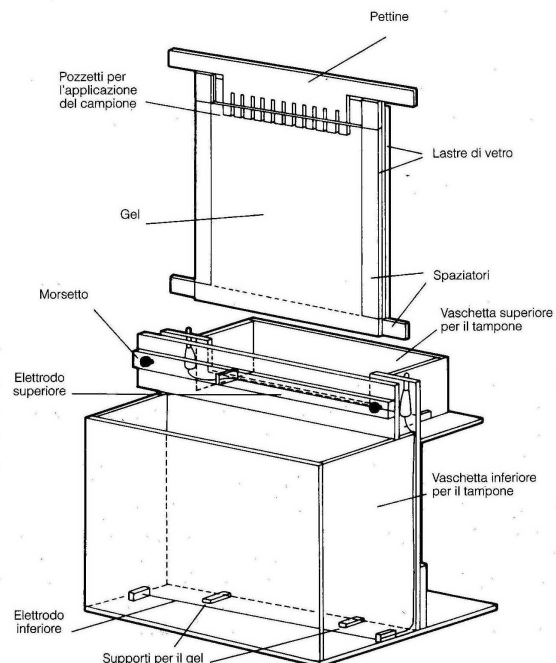
(www.wikipedia.it)

Kaneko et al. (1983) verificarono che era possibile separare gli spermatozoi X ed Y utilizzando una particolare tecnica di elettroforesi a flusso, in particolare venivano ottenuti spermatozoi Y all'anodo (polo negativo) e spermatozoi X al catodo (polo positivo).

E' stato ipotizzato che la separazione avvenga per via delle differenti cariche di superficie presenti sugli spermatozoi X e Y. (A. Galli et al., 2003)



Macchinario per elettroforesi



ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

L'agarosio è un polisaccaride lineare e neutro, formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio, legate alternativamente con legami glicosidici. L'agarosio inoltre è uno zucchero solubile in acqua alla temperatura di ebollizione, mentre diventa solido con il raffreddamento, formando una matrice attraverso legami a idrogeno tra le catene lineari.

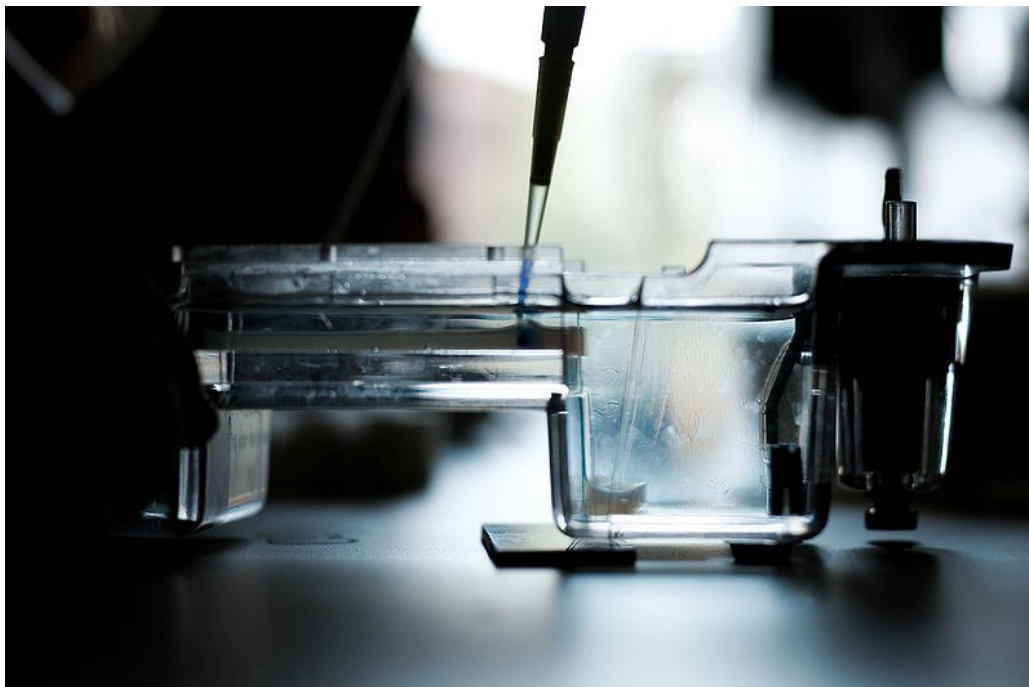
L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica che serve per analizzare e purificare il DNA “tagliato” precedentemente da enzimi di restrizione.

Tale metodica usa le cariche presenti nelle molecole di DNA, che sono caricate negativamente, per farle correre attraverso un gel di selezione fatto da una rete di pori, che ha la funzione di separare le molecole in base alla loro grandezza, le più piccole attraversano più velocemente i pori rispetto a quelle più grandi, quindi si avrà una separazione in funzione alla velocità.

I campioni da analizzare vanno depositati, con una micropipetta, in fenditure verticali, dette pozzetti, praticate nel gel a poca distanza dal margine, dalla parte del polo negativo.

Essendo il DNA un polianione, i frammenti migreranno verso il polo positivo.

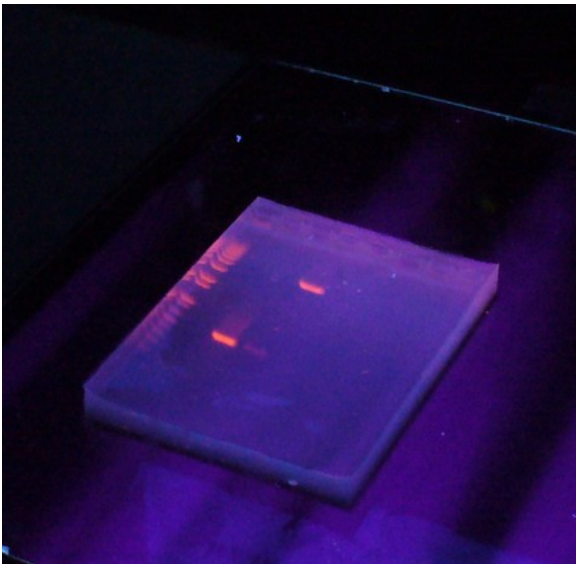
Al momento del caricamento, al campione si aggiunge di solito una “soluzione di caricamento”, colorata con blu di bromofenolo e xilene cianolo, contenente glicerolo per agevolare la precipitazione del campione sul fondo del pozzetto. (www.wikipedia.it)



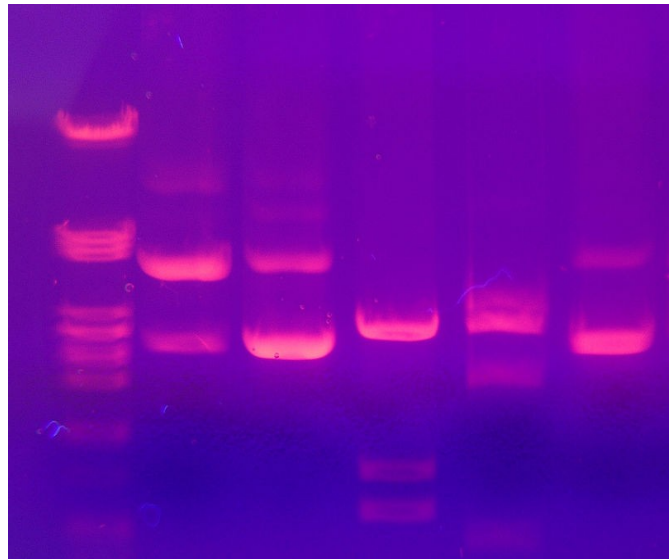
L'elettroforesi su gel è anche uno strumento molto utile per purificare uno specifico frammento di DNA, in questo caso per facilitare il recupero si usa un colorante che permette una visualizzazione maggiore.

Esistono diversi tipi di coloranti anche se quello più utilizzato è il bromuro di etidio, che è una molecola planare che si inserisce tra le basi impilate del DNA a doppio filamento. Questa molecola, quando esposta ai raggi ultravioletti, è in grado di emettere fluorescenza, che si intensifica di quasi venti volte se intercalata nel DNA.

L'etidio di bromuro può essere aggiunto direttamente al gel (la velocità di migrazione si riduce del 10-15%) o dopo l'elettroforesi. (www.wikipedia.it)



Gel esposto a luce ultravioletta, il bromuro di etidio legato al DNA emana luce fluorescente arancione



Frammenti di DNA separati tramite elettroforesi su gel, colorati con bromuro di etidio ed esposti a luce ultravioletta

ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMIDE

E' una tecnica per analizzare e separare proteine e per sequenziare il DNA.

Il gel si prepara per polimerizzazione di una soluzione di un monomero monofunzionale, l'acrilamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), e uno bifunzionale, la N,N'-metil-bis-acrilamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$).

Il processo di polimerizzazione dell'acrilamide viene innescato dall'aggiunta di TEMED (tetrametiletilendiammina) che è il catalizzatore della reazione di polimerizzazione dell'acrilamide.

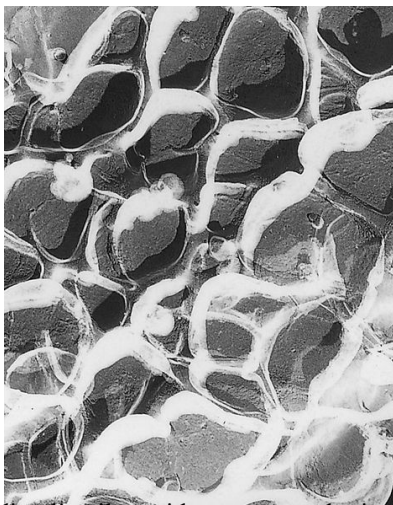
Il gel di poliacrilamide è un supporto utilizzato per la sua porosità omogenea e riproducibile.

La dimensione media dei pori è determinata sia dalla concentrazione totale dei monomeri, che dalla percentuale di monomero bifunzionale rispetto ai monomeri totali. (www.wikipedia.it)

Gel con percentuale bassa, dal 3 al 5%, possiedono pori di grosse dimensioni e sono utilizzati nei gel d'impaccamento che permettono il caricamento e la concentrazione del campione.

Il gel di separazione vero e proprio presenta una percentuale compresa fra l' 8 ed il 20%.

Prima che il gel polimerizzi, si sistema sul lato superiore del gel un "pettine" di plastica che, a gelificazione ultimata, viene tolto lasciando nel gel i pozzetti di alloggio per il caricamento dei campioni. (www.units.it)



Gel di poliacrilammide osservato al microscopio elettronico a trasmissione. Sono visibili i pori del gel.



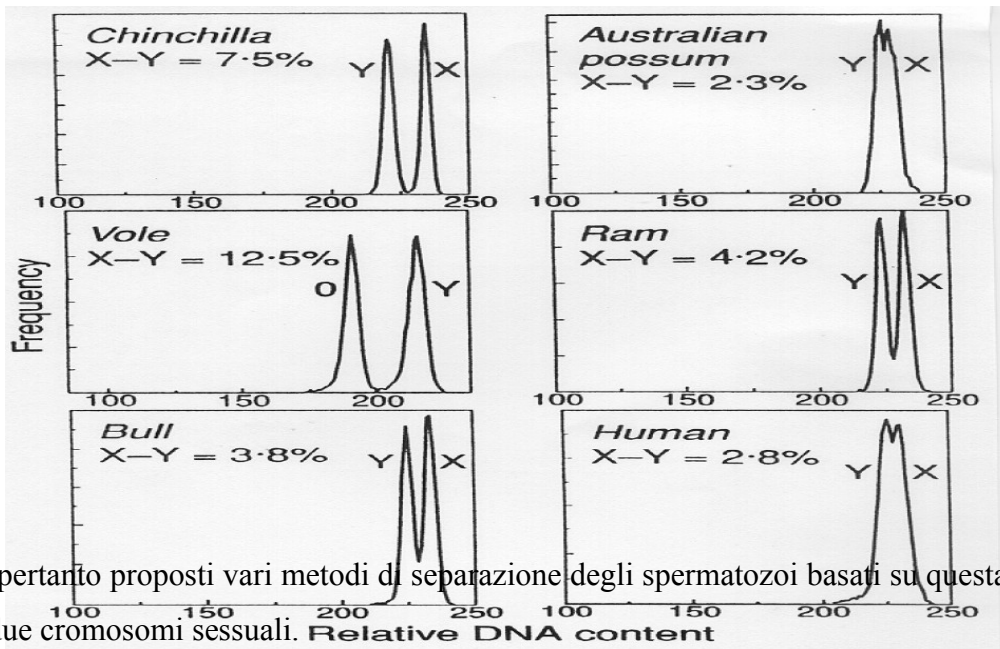
Vaschetta per elettroforesi su gel di poliacrilammide.

Il grosso limite della procedura è dato dal fatto che dopo questo trattamento gli spermatozoi risultano immobili e pertanto non sono utilizzabili per la fecondazione. (A. Galli et al., 2003)

Centrifugazione e filtrazione

Il cromosoma X è più grande e più pesante del cromosoma Y, contenendo più DNA.

DIFFERENZE PERCENTUALI NEL CONTENUTO DI DNA TRA I CROMOSOMI X E Y



Sono stati pertanto proposti vari metodi di separazione degli spermatozoi basati su questa differenza fisica dei due cromosomi sessuali.

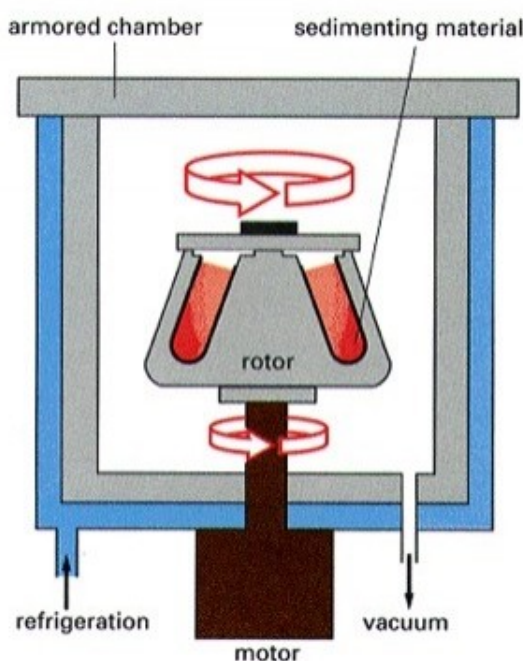
Kaneko et al. (1986) e Lizuka et al. (1987) hanno dimostrato che era possibile ottenere un arricchimento di spermatozoi X utilizzando la centrifugazione in gradiente di Percoll. (A. Galli et al., 2003)

Tale metodo di centrifugazione viene usato quando si desidera ottenere una più precisa separazione delle molecole o delle particelle. Per questa procedura si riempie la provetta con una colonna di liquido la cui densità risulta crescente man mano che ci si sposta verso il fondo della provetta.

Il gradiente stabilizza la colonna di liquido nella provetta, previene il rimescolamento per moti connettivi delle particelle separate e migliora la risoluzione della separazione. (www.molecularlab.it)

Il Percoll è una sostanza a base di silicio colloidale che consente di separare le cellule secondo il loro gradiente di densità. (G.M. Lentini, 2009)

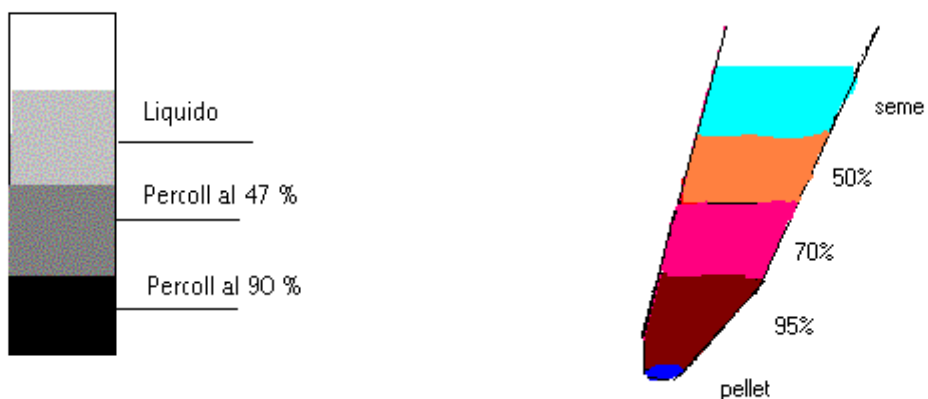
Tale sostanza è quindi usata in soluzione macinata (es: 95%, 70%, 50%). (C. Bullella et al., 2003)
In pratica, in una provetta si deposita il liquido seminale



Il liquido seminale viene centrifugato in un gradiente di densità crescente, si depositano i spermatozoi X e Y in strati separati.

In questo modo si otterrà una separazione degli elementi presenti nel liquido seminale in rapporto alla loro densità: in fondo alla provetta troveremo gli spermatozoi più mobili, mentre quelli immobili e i detriti si troveranno nella porzione superiore.

Il sedimento così ottenuto viene quindi diluito e lavato, prima di essere usato per l'inseminazione. (G.M. Lentini, 2009)



Provetta con i tre gradienti alla fine della centrifugazione

Dopo la centrifugazione, nella provetta risulteranno esserci tre strati: uno superiore, costituito da detriti e plasma seminale, uno intermedio, contenente spermatozoi mobili all'interfaccia tra i due gradienti, e uno inferiore, costituito da spermatozoi altamente mobili alla base dei gradienti all'80%.

Sul fondo della provetta troveremo quindi gli spermatozoi con cromosoma X, che essendo più grandi e più pesanti raggiungeranno più facilmente l'ultimo strato.

Il sedimento deve essere sospeso in 1-2 ml di mezzo e centrifugato in modo da diluire e rimuovere le tracce dei gradienti. Alla fine dell'ultima centrifugazione il sedimento si sospende nuovamente in 0,5 ml di mezzo e si utilizza per l'inseminazione.

Lo svantaggio di tale tecnica è che gli spermatozoi migliori si ritrovano nelle frazioni a maggiore densità alla base della provetta; quindi è necessario, prima di utilizzarli, procedere al lavaggio finale in un mezzo fisiologico per rimuovere le particelle di gradienti dal campione. (R. Schillaci, 2000)

Sono stati ottenuti dei buoni risultati sul bovino, ma la procedura non è standardizzabile e richiede comunque un sistema di analisi rapido ed efficace per valutare, dopo la raccolta degli spermatozoi centrifugati, il livello di arricchimento. (A. Galli et al., 2003)

Inoltre è evidente come tale tecnica risulti essere molto più utile per una valutazione degli spermatozoi, tra mobili e immobili, piuttosto che per una vera e propria divisione tra spermatozoi con cromosoma X e spermatozoi con cromosoma Y.

Anche in campo umano, recentemente, l'uso del Percoll per la selezione degli spermatozoi è stato bandito nell'ambito della pratica clinica, e può essere impiegato solo in programmi di ricerca. (Gellert-Mortimer et al., 1988; Sbracia et al., 1996)

Quindi il Percoll viene tutt'oggi sostituito da preparati simili che utilizzano silice colloidale ricoperto da silice. (S. Bianchi e P.E.L. Setti, 2007)

Un altro sistema è quello relativo all'uso della centrifugazione con albumina, molto usato in campo umano e meno in campo bovino.

Questo metodo fu messo a punto da Ericsson et al. (1973) e più volte utilizzato e testato, e consente di separare spermi Y nella porzione più bassa della colonna di albumina. (A. Galli et al., 2003)

L'albumina è l'unica proteina del plasma prodotta dal fegato, ed è contenuta anche nel latte e nell'albume delle uova, da cui prende il nome. (www.wikipedia.it)

Essa rappresenta la plasma-proteina quantitativamente più importante ed assolve a significative funzioni di trasporto di ormoni, minerali (tra cui il Calcio), bilirubina, vitamine e farmaci.

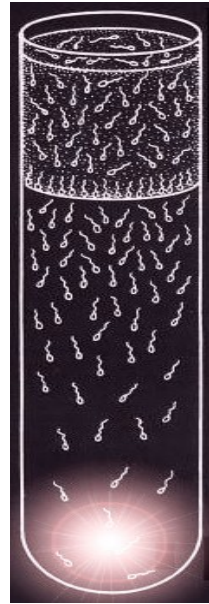
L'albumina viene eliminata dall'organismo attraverso il rene e l'intestino, e il 90% di quella filtrata dal rene viene normalmente riassorbita a livello del tubulo prossimale. (M. Estrella, 2006)

Un'altra importante funzione dell'albumina nell'organismo si verifica durante la capacitazione degli spermatozoi, perché essa è in grado di rimuovere il colesterolo dalla membrana plasmatica dello spermatozoo. L'allontanamento del colesterolo innescherebbe così il processo di capacitazione. (Davis et al., 1979; Suzuki and Yanagimachi, 1989; Cross, 1998)

Il metodo di Ericsson per la separazione degli spermatozoi si basa sul presupposto che gli spermatozoi Y si muovano più velocemente degli spermatozoi con cromosoma X.

Il liquido seminale contenente gli spermatozoi da separare viene posto in una provetta in cima a una "colonna" di strati sempre più concentrati di albumina.

Dopo un determinato periodo di tempo, solo gli spermatozoi più mobili dovrebbero essere stati in grado di raggiungere il fondo della provetta.



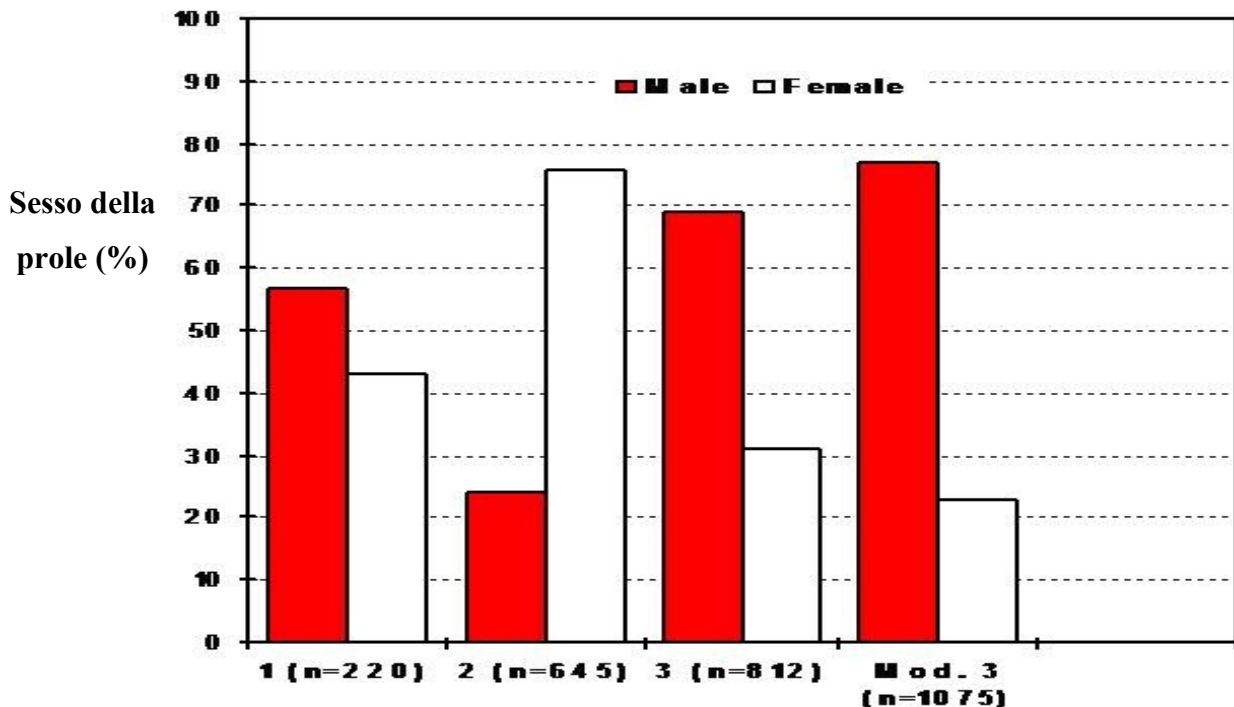
Tale sistema segue diverse tappe di preparazione:

- l'albumina sierica umana (HSA) viene stratificata a diverse concentrazioni in una provetta (es: 8% e 18%);
- dopo che il liquido seminale è stato centrifugato, lavato e diluito, viene stratificato in cima alla colonna di albumina;
- la provetta con il liquido e l'albumina viene lasciata riposare per circa un'ora, permettendo agli spermatozoi di penetrare l'albumina;
- lo strato superiore viene poi scartato, e la colonna viene lasciata a riposare per altri trenta minuti;
- in seguito lo strato successivo (in origine il livello medio) viene scartato;
- lo strato rimasto sul fondo viene centrifugato, e di questo solo il pellet, ossia il sedimento sul fondo, viene conservato e preparato per l'inseminazione artificiale. (Ericsson et al., 1994)



L'albumina sierica umana (HSA) è stata impiegata per questa procedura. Quanto è stato proposto che il passaggio attraverso l'HSA inattivi gli spermatozoi con cromosomi X arricchendo invece la popolazione di Y.

E' stato dimostrato , però, che in seguito a questo processo, pur ottenendo un leggero arricchimento di spermatozoi con cromosoma Y, si riduce notevolmente la motilità, fattore fondamentale per la riuscita del concepimento. (G.A. Rose and A. Wong, 1998)



ES: RISULTATI CLINICI SU 2/52 nascite:

1. infertilità
2. selezione degli spermatozoi X
3. selezione degli spermatozoi Y
4. selezione degli spermatozoi Y

(RJ Ericsson, 2008)

Comunque i buoni risultati ottenuti per la specie umana non sono stati ottenuti sui bovini. (A. Galli et al., 2003)

Filtrazione in colonne di Sephadex

La filtrazione del seme bovino in colonne di Sephadex consente la raccolta di sperm X, altamente mobili, nella prima frazione del filtrato. (Steen et al., 1975)

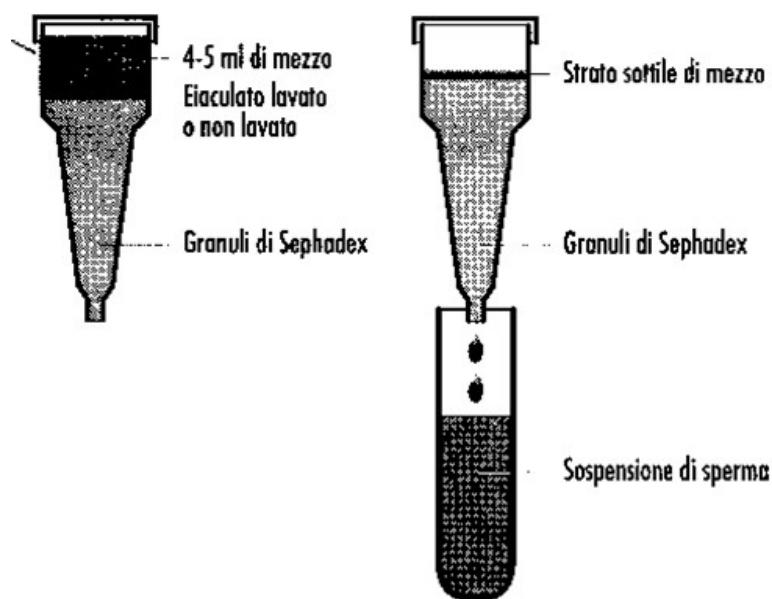
Esecuzione:

si aggiunge l'eiaculato al di sopra della colonna di Sephadex, che può essere acquistata già pronta per l'uso. Se il campione è molto viscoso, potrebbe intasare la colonna, quindi è opportuno procedere al lavaggio preliminare.

Si ricopre poi il campione seminale con circa 4-5 millilitri di mezzo in modo che tutto possa filtrare dalla colonna a una provetta da centrifuga.

Successivamente si procede a centrifugare a 200 grammi per 10 minuti circa.

Il sedimento così ottenuto deve essere nuovamente sospeso in 0.5 millilitri di mezzo arricchito con albumina sierica umana 0.3%; a questo punto il seme è pronto per l'inseminazione. (R. Schillaci, 2000)



Isolamento di spermatozoi mobili su colonne di Sephadex

La filtrazione in colonne di Sephadex permette quindi di selezionare una popolazione ricca in ginospermi, spermatozoi recanti il cromosoma X. (G. Guastella et al., 1988)

I metodi appena illustrati solo saltuariamente consentono di ottenere risultati adeguati, in termini di arricchimento nemaspermico. (A. Galli et al., 2003)

CAPITOLO 3

Attualmente il seme sessato viene prodotto utilizzando la citofluorimetria a flusso, dopo fluorocromatizzazione degli spermatozoi e loro *sorting* in base alla quantità di DNA posseduto. (Balduzzi, 2007)

Definendo il *sorting* in funzione della bi-modalità della distribuzione di frequenza del contenuto di DNA degli spermatozoi è possibile sia quantificare gli spermatozoi X e Y, che dividerli in due popolazione, quella X e quella Y. (Johnson et al., 1989)

CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO

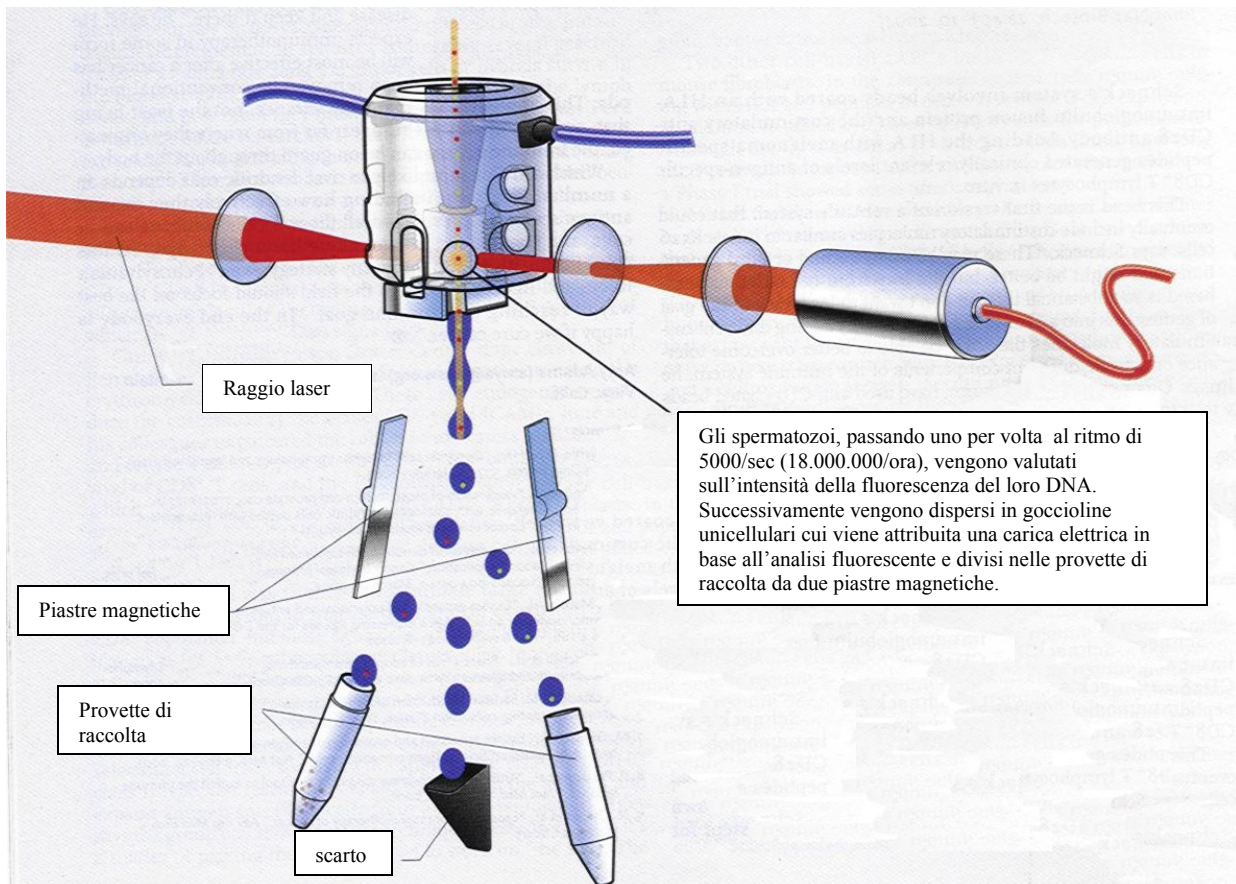
Una delle poche tecniche ripetibili per classificare il sesso dello sperma ad alti livelli di purezza usa un congegno chiamato citofluorimetria a flusso, per individuare una differenza dal 3 al 4% nel contenuto di DNA degli spermatozoi maschili e femminili, e classificarli con più del 90% di purezza. (D. Thorbahn, 2008)

Il citofluorimetro a flusso è un sistema che consiste di uno o più raggi laser, di un sistema fluidico che immette le cellule da analizzare in un flusso di liquido isosmotico, di una serie di rilevatori di luce (fotodiodi e/o fotomoltiplicatori) e di un computer per l'analisi dei dati in tempo reale.



L'analisi si basa sulla valutazione della luce emessa dalle cellule in esame una volta che incontrano sul loro percorso il raggio laser. (A. Galli et al., 2003)

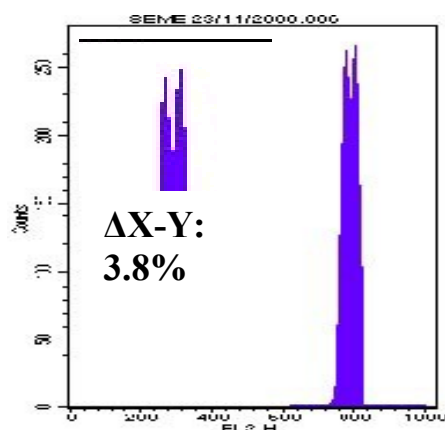
PROCEDIMENTO



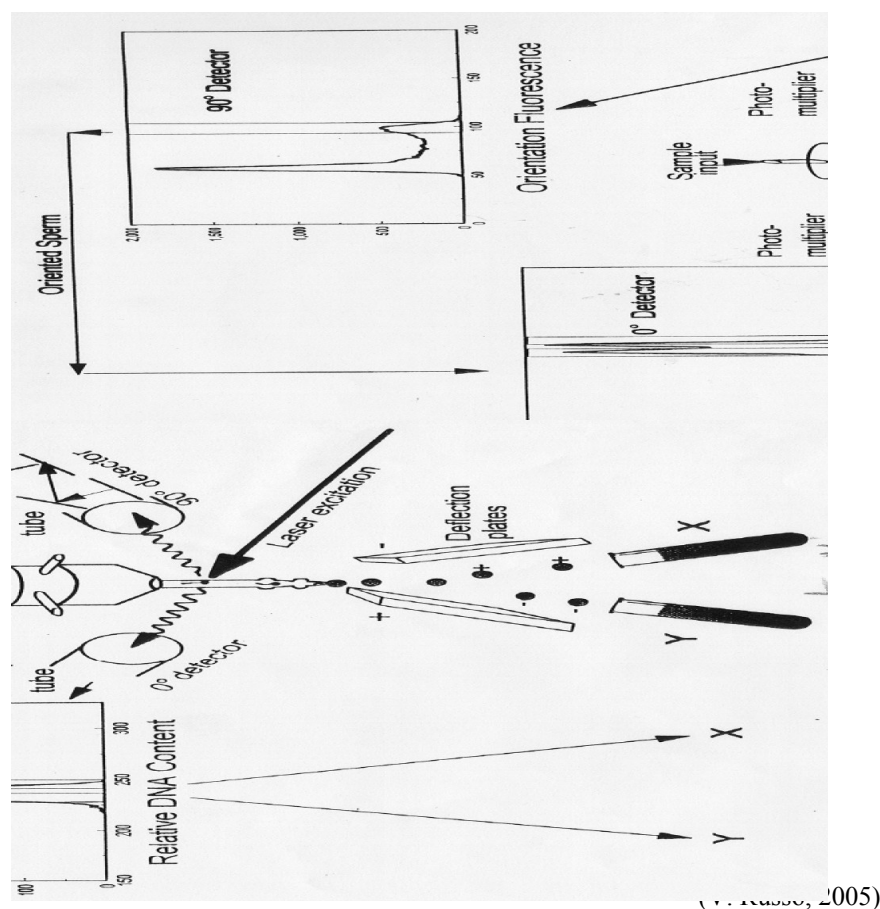
Schema di funzionamento del citofluorimetro a flusso

Il primo passaggio di questa procedura è diluire lo sperma fino a concentrazioni molto basse e colorare gli spermatozoi con una tintura fluorescente (D. Thorbahn, 2008), usando ad esempio coloranti quali il Bisbenzimidide Hoechst 33342, un agente che si lega alle basi adenina e timina del DNA e che, a concentrazioni generalmente usate in citometria a flusso, non nuoce alla vitalità cellulare né al potere fecondante degli spermatozoi e non presenta effetti teratogeni sulla discendenza. (A. Galli et al., 2003)

Il campione viene poi fatto passare attraverso il citofluorimetro a flusso a 60 migliaia all'ora, da 30 a 60 unità di pressione. A causa della maggior grandezza dei cromosomi X, gli spermatozoi femminili emettono una fluorescenza leggermente maggiore rispetto a quelli maschili, che possiedono il cromosoma Y che è più piccolo e contiene circa il 3,8% in meno di DNA.



SEPARAZIONE DEGLI SPERMATOZOI CONTENENTI I CROMOSOMI Y E X MEDIANTE CITOFUORIMETRIA A FLUSSO



Successivamente è possibile spezzare il flusso in piccole gocce, contenenti ognuno una particella. Il meccanismo di funzionamento del citofluorimetro si basa sul principio di comportamento delle particelle, costituenti la materia in presenza di una fonte energetica eccitante; infatti la materia si può considerare come composta da particelle dotate di cariche elettriche discrete e di segno opposto, che una volta colpite da un'onda elettromagnetica oscillano, liberando a loro volta radiazioni elettromagnetiche in tutte le direzioni (radiazione diffusa) e il fenomeno ad esso associato è noto come *light scattering* (LS) (F. Crescentini, 2004).

Utilizzando parametri legati a LS è possibile risalire alle dimensioni del campione e alla sua granularità relativa (complessità interna).

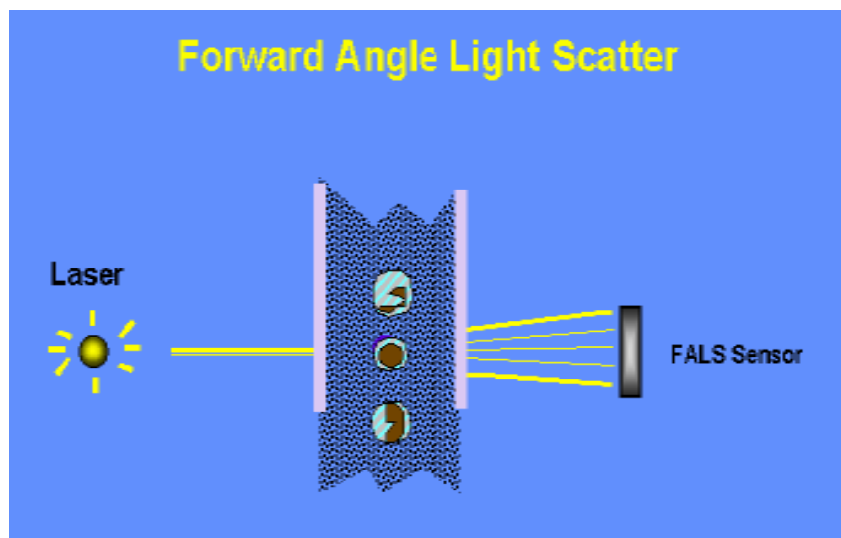
Gli spermatozoi bovini, essendo piatti, una volta immessi nel flusso del citofluorimetro incominciano a ruotare e quelli che incrociano il raggio laser perpendicolarmente alla loro superficie maggiore emettono più fluorescenza rispetto agli altri.

Questo fatto è molto importante poiché, essendo molto piccola la differenza di DNA fra gli spermatozoi maschili rispetto a quelli femminili (circa il 3,8%), la variabilità di fluorescenza emessa dallo spermatozoo, in conseguenza del suo orientamento, si può “sovrapporre” alla differenza di DNA fra gli spermatozoi di sesso differente.

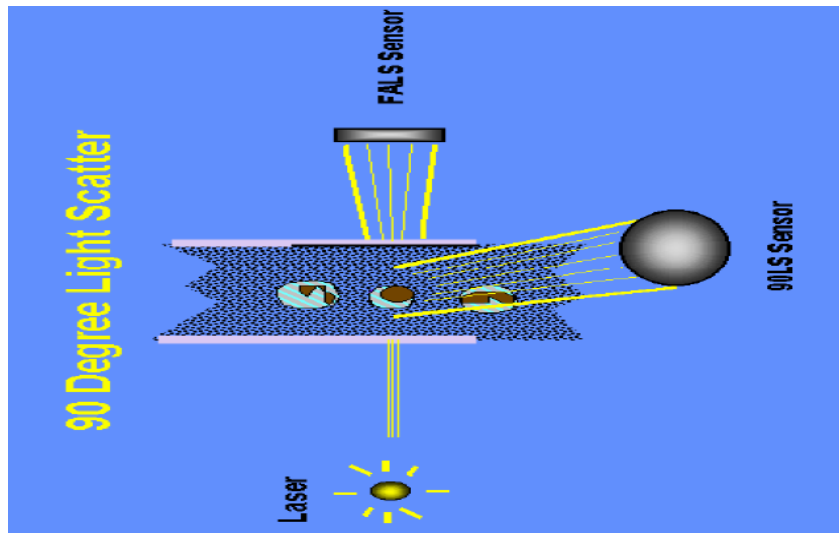
Ecco allora nascere l’esigenza di “definire” l’orientamento degli spermatozoi immessi nel flusso modificando opportunamente l’apertura dell’ago usato per inserire gli spermatozoi nel flusso e di “raccolgere” la fluorescenza non solo a 90 gradi, come usualmente viene fatto nei citofluorimetri, ma anche a 0 gradi, ovvero frontalmente al raggio laser. (A. Galli, 2003)

Quando si utilizza un citometro a flusso, quindi, i dati di LS vengono generalmente acquisiti in diffusione centrale e laterale:

- La diffusione frontale FSC (*forward scattering*) è rilevata a 0° mascherando il fascio di radiazione (permette di identificare il diametro relativo cellulare);

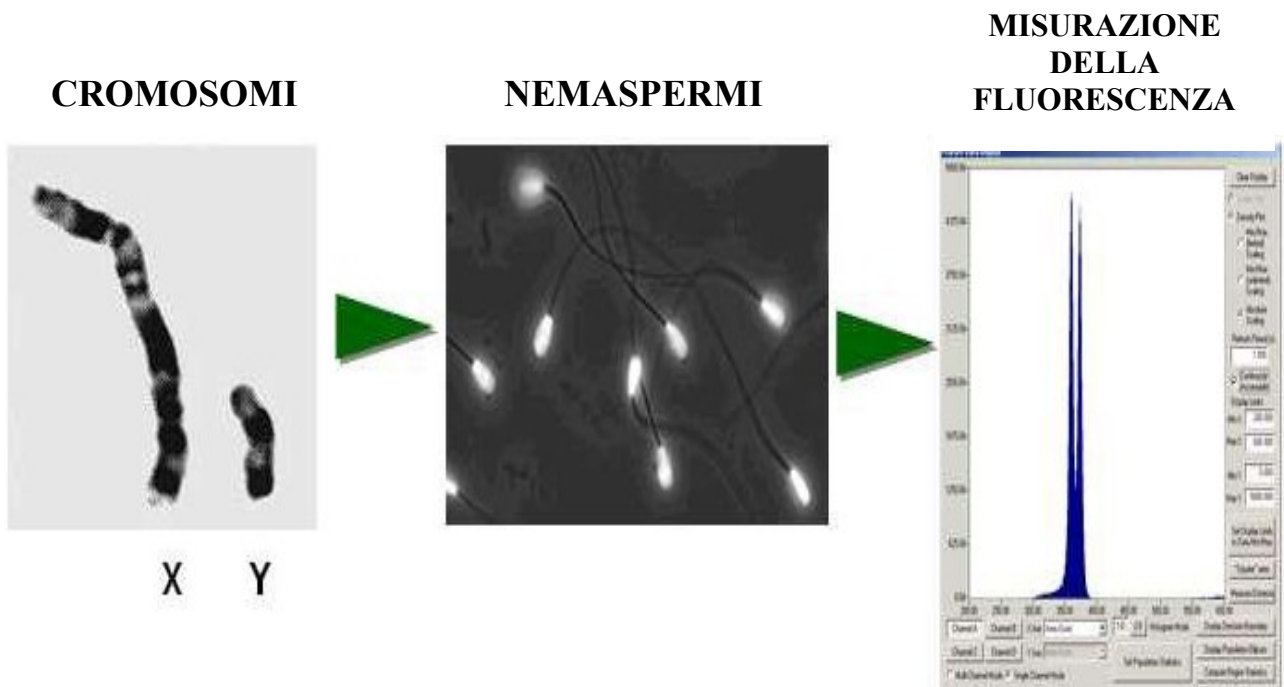


- La diffusione laterale SSC (*side scattering*) è rilevata a 90° rispetto la direzione di propagazione del fascio investigante (permette di rilevare la granulosità citoplasmatica relativa e la complessità interna della cellula);



Segnalatori misurano quindi la quantità di fluorescenza emessa dagli spermatozoi e assegnano carica positiva o negativa ad ogni gocciolina contenente un singolo spermatozoo.

Placche elettricamente cariche dividono poi il singolo flusso in tre flussi differenti: le particelle con carica positiva contenenti un sesso vengono deviate da una parte del congegno, le particelle con carica negativa contenenti l'altro sesso vanno nella direzione opposta, mentre le gocce senza cariche contenenti spermatozoi misti o non identificati passano dritti attraverso la macchina. (D. Thorbahn, 2008)



3,85% differenza
contenuto DNA

Spermatozoi in fluorescenza
con UV

Differenza di magnitudo
alla fluorescenza di
X e Y

(C.

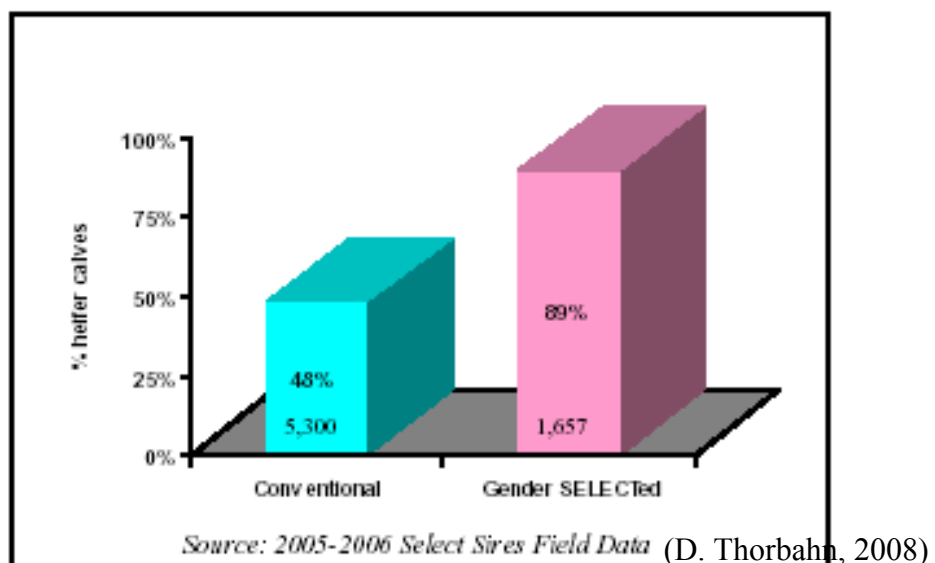
Bacchiocchi, 2009)

Il materiale raccolto e separato può successivamente essere immesso nuovamente nel flusso per verificare l'efficienza della separazione. (A. Galli et al., 2003)

Inizialmente la tecnica di separazione era alquanto lenta producendo circa 300.000 spermatozoi separati all'ora. Era possibile quindi ottenere una dose fecondante congelata con una concentrazione adeguata di spermatozoi, da 2 a 4 milioni, in una giornata di procedimento di separazione. (M.L. Sandionigi e G. Praderio, 2001-2003)

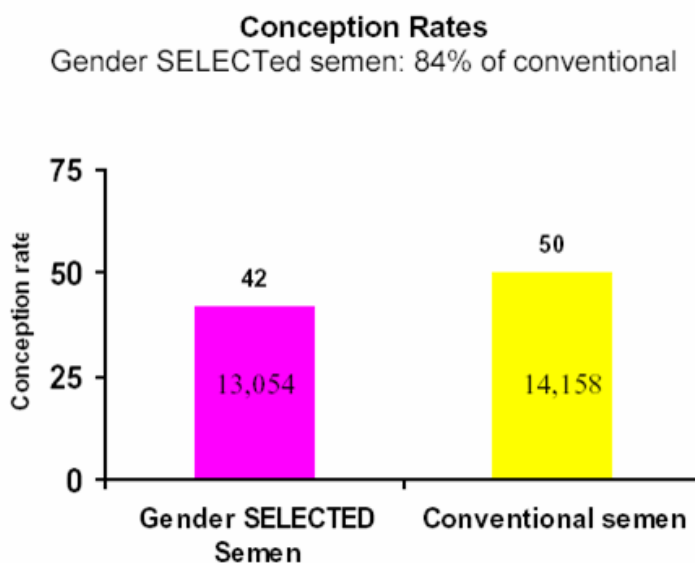
Negli ultimi anni la tecnica è stata ottimizzata modificando aspetti di fluido-dinamica, permettendo una maggiore resa di spermatozoi correttamente orientati dal 25 al 70% ed un numero di spermatozoi raccolti molto elevato, arrivando a 6 milioni/ora ed un livello di purezza del 90%. (M.L. Sandionigi e G. Praderio, 2001-2003) Comunque questo lascia ancora il 10% di sesso indesiderato disponibile a competere per la fertilizzazione.

Gender Bias of Calves Reported To Date



LIMITI DELLA PROCEDURA

Ci sono molte limitazioni importanti che hanno rallentato lo sviluppo del seme sessato. Senza dubbio, una ridotta percentuale di concepimento è l'ostacolo principale. Il sessaggio del seme è un procedura particolarmente invasiva che impatta negativamente sulla vitalità degli spermatozoi e sulla longevità, rispetto alla normale crioconservazione del seme.



Inoltre, la procedura di selezione sessuale, attraverso la separazione, gli spermatozoi devono essere selezionati attraverso il laser che attraversa i rilevatori di fluorescenza nel citofluorimetro.

Source: 2005-2006 Select Sires

A causa della forma piatta delle teste degli spermatozoi bovini, solo circa il 30% di essi sono correttamente orientati e metà di loro sono femmine. Ne consegue che solo il 15% degli spermatozoi messi nella macchina sono recuperati come prodotto sessato vendibile!

L'alta percentuale di spermatozoi persi preclude l'uso della più alta elite di tori per produrre seme sessato.

Sebbene da 3000 a 5000 spermatozoi al secondo per ogni procedimento di separazione sembrano tanti, questo si traduce in circa un'ora e mezza di sessaggio per sviluppare seme sufficiente per un dosaggio standard di 20 milioni di spermatozoi a paillettes.

Di conseguenza, a causa della lentezza del processo, commercializzazione del seme sessato è possibile solo con un numero molto basso di spermatozoi per dose (circa 2 milioni).

Inoltre anche l'elevato costo del macchinario per la citofluorimetria a flusso e la necessità di laboratori altamente specializzati per il sessaggio implicano una spesa notevole e lunghi tempi di ammortizzamento (D. Thorbahn, 2008) ... che si traduce inevitabilmente in un aumento del costo

delle dosi contenenti seme sessato (circa tre volte il seme convenzionale). (M.L. Sandionigi e G. Praderio, 2001-2003)

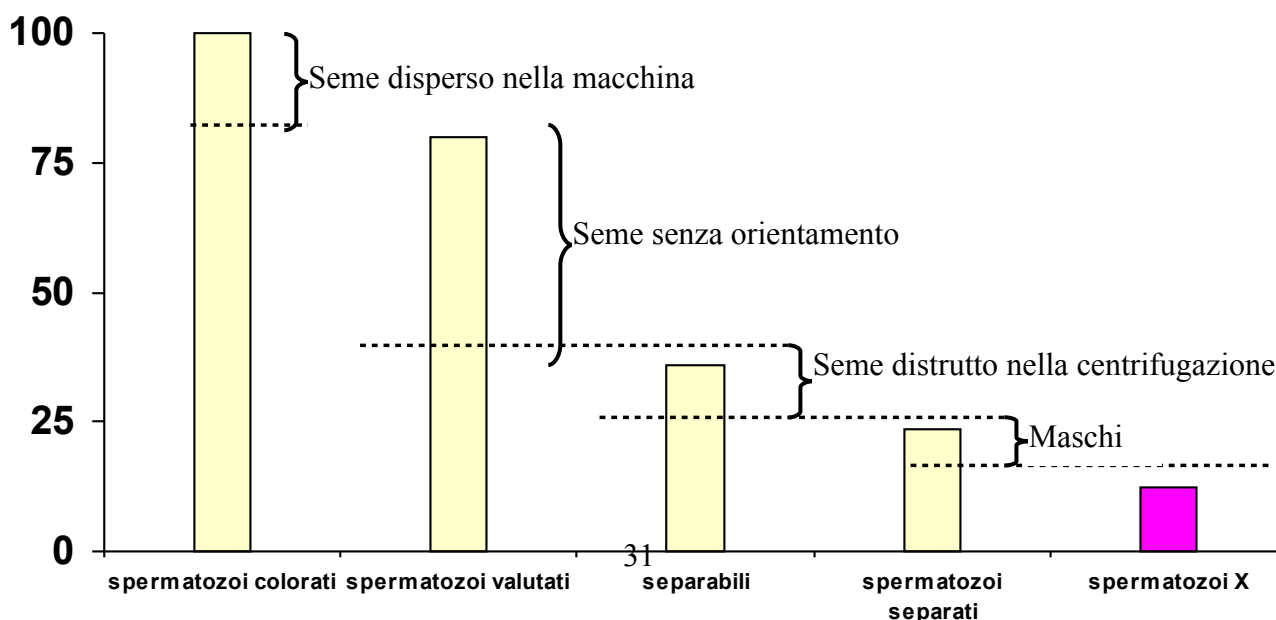
Dopo quanto precedentemente detto, è possibile ipotizzare:

- 1- aspettare che le tecnologie raggiungano un livello tale da rendere perfettamente sostituibile l'utilizzo di seme convenzionale con seme sessato;
- 2- ignorare queste limitazioni ed utilizzare il seme sessato nello stesso modo di quello convenzionale, in altre parole fare uso di questo materiale costoso senza cura o particolare attenzione ai programmi di accoppiamento (questo determinerebbe l'insuccesso di tale tecnologia);
- 3- riconoscere le limitazioni e sviluppare nuovi protocolli di fecondazione formulati appositamente per il seme sessato.

In altre parole formulare programmi che utilizzino materiale seminale sessato in maniera efficienti ed economicamente validi.

Oltre alle limitazioni sopra accennate, questa tecnologia ha posto in primo piano l'importanza della valutazione del materiale seminale bovino pre- e post- trattamento, in quanto la spermatogenesi è caratterizzata da una marcata sensibilità a diversi fattori endogeni ed esogeni, e solo gli spermatozoi perfettamente integri possono sopravvivere al trattamento di separazione e congelamento. (M.L. Sandionigi e G. Praderio, 2001-2003)

Le perdite di spermatozoi durante il processo di sessaggio



VERIFICA DEL SESSAGGIO

L'evoluzione della tecnologia di sessaggio tramite citofluorimetria a flusso ha richiesto lo sviluppo in parallelo di un metodo sensibile ed accurato che consentisse la determinazione della *sex ratio* (pY: misura della percentuale di spermatozoi "Y") di un campione di seme per la verifica della purezza del seme sessato separato dal citofluorimetro a flusso.

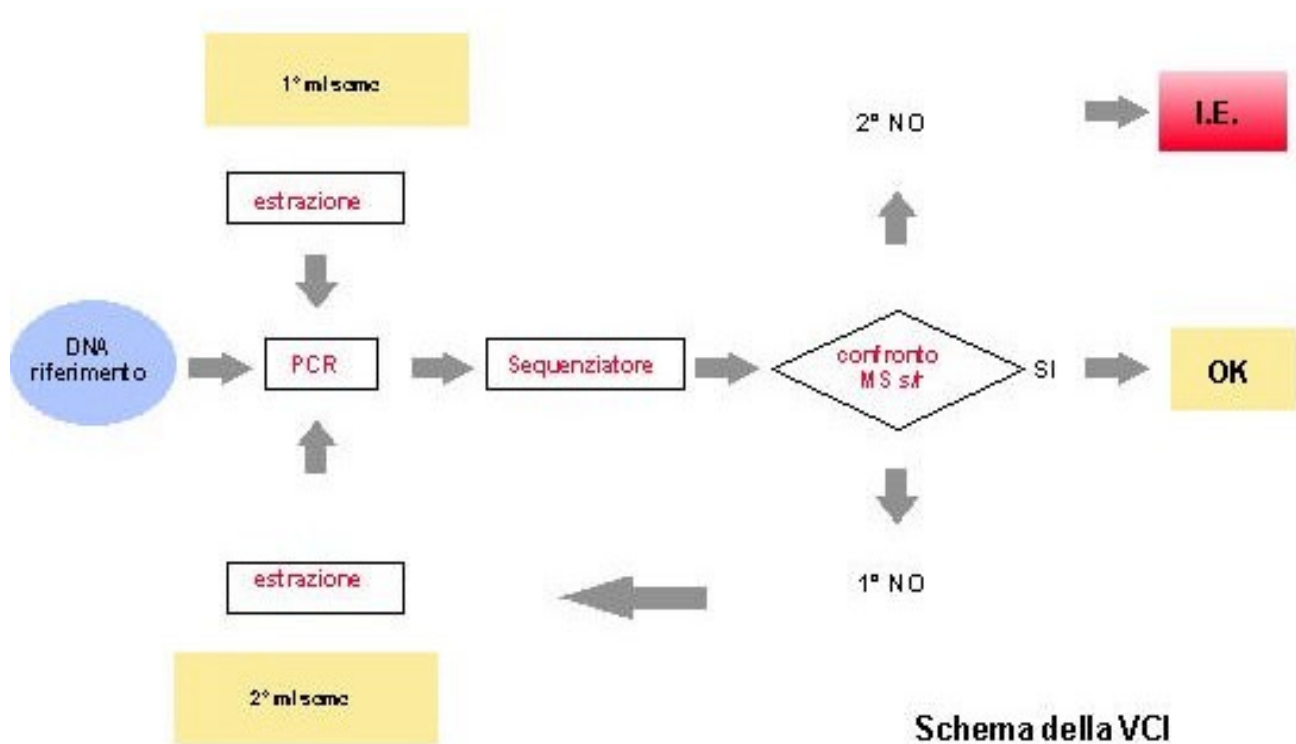
Assumendo corretto il settaggio del citofluorimetro, un primo sistema di verifica del livello di arricchimento raggiunto durante il sessaggio del seme è quello che prevede di **riciclare il campione sortato**. In questo modo si verifica la uni-modalità della popolazione di spermatozoi, in contrasto con la bi-modalità della popolazione originale. (A. Galli, 2003)

Passando a sistemi di laboratorio diversi, che prevedono essenzialmente un approccio genetico-molecolare, la verifica veniva inizialmente effettuata tramite **PCR semi-quantitativa**, utilizzando come standard la curva di taratura ottenuta dalle diluizioni progressive del DNA estratto da sangue di toro e confrontando l'intensità delle bande fra standard e campioni.

Questo tipo di metodica presentava però diversi limiti tra i quali il dosaggio che avveniva per classi di frequenza su uno standard non lineare, a causa della diversa efficienza di amplificazione dei diversi punti della curva. (A. Galli, 2003)

Inoltre tramite la PCR (Polimerase Chain Reaction – reazione a catena della polimerasi) viene effettuata l'identificazione del campione, che garantisce al consumatore l'effettiva appartenenza del seme al toro di provenienza, per evitare eventuali frodi.

Schema della corretta valutazione di identificazione



La verifica della corretta identificazione prevede le seguenti fasi:

1. Estrazione del DNA dal materiale biologico di riferimento e dal seme;
2. Dosaggio del DNA;
3. Amplificazione del DNA;
4. Analisi dei frammenti;
5. Acquisizione ed analisi dei dati. (A.Galli et al 2004)

1. Estrazione del DNA:

L'estrazione del DNA permette l'isolamento dello stesso partendo da materiale organico (seme, sangue ed eventualmente bulbo pilifero). La metodica ottimizzata dall'Istituto prevede una fase iniziale di precipitazione delle cellule seguita da una di lisi delle stesse. Dal lisato così ottenuto viene poi separato il DNA che successivamente viene purificato da contaminanti.

2. Dosaggio del DNA:

La determinazione della concentrazione del DNA estratto da materiale biologico risulta di fondamentale importanza per affrontare le successive fasi di lavorazione. Tale determinazione viene eseguita tramite spettrofotometro (Pharmacia Biotech), specificatamente studiato per la biologia molecolare, sfruttando la proprietà delle basi eterocicliche di assorbire la luce ultravioletta (spettrofotometria di assorbimento). La concentrazione del DNA ottenuto dal materiale biologico di riferimento viene determinata allo scopo di costituire per ciascun campione una quantità di DNA tale da permettere l'effettuazione del test di identità per almeno 10 anni, come previsto dal DM. 27/12/94.

3. Amplificazione del DNA:

L'amplificazione dei microsatelliti del DNA avviene in un termociclatore tramite una reazione chiamata PCR (Polimerase chain reaction - reazione a catena della polimerasi), utilizzando come *primers* specifiche sequenze oligonucleotidiche diverse a seconda della specie. Per il DNA ottenuto dal materiale biologico di riferimento vengono utilizzati oligonucleotidi fluorescinati in maniera differente rispetto a quelli del seme.

4. Analisi dei frammenti:

Dopo l'amplificazione, aliquote di ciascuna PCR dello stesso riproduttore vengono miscelate e diluite, vi viene aggiunto dello standard interno per permettere l'assegnazione automatica delle dimensioni dei microsatelliti e vengono caricate in un gel denaturante di poliacrilamide per la separazione elettroforetica, condotta in un sequenziatore automatico.

5. Acquisizione ed analisi dei dati:

Dai dati ottenuti viene ricavata la dimensione allelica espressa in paia di basi (bp). La VCI è corretta quando la differenza allelica fra seme e campione biologico di riferimento è inferiore a 2 bp; la VCI è errata quando la differenza allelica risulta uguale/superiore a 2 bp. (A.Galli et al 2004)

Presso alcuni centri di ricerca, come l'Istituto Spallanzani, è stato deciso di sviluppare un nuovo protocollo in **Real Time PCR** utilizzando una chimica TaqMan. (A. Galli, 2003)

La PCR real time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee di DNA.

Il DNA viene amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi. Dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato.

I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA doppio - filamento (ds) e gli oligonucleotidi modificati del DNA (denominati sonde) che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA. (www.wikipedia.it)

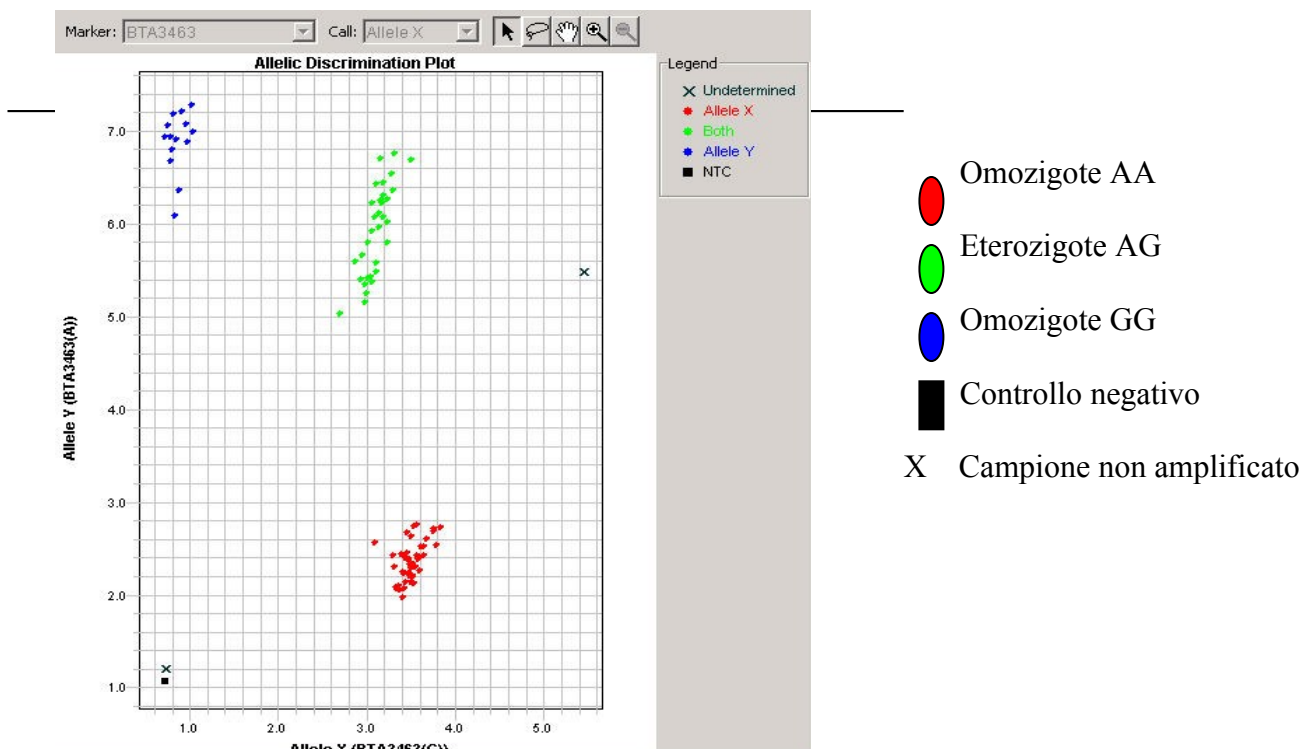
La chimica TaqMan utilizzata in PCR Real Time, inoltre, si basa sul seguente principio: durante la reazione di PCR l'attività esonucleasica della TAQ DNA-polimerasi scalza la sonda che si è ibridizzata con il filamento stampo del campione di DNA analizzato, con conseguente emissione di fluorescenza.

Quest'ultima viene misurata ad ogni ciclo di amplificazione per opera di un software specifico SDS (*Sequenze Detection System*).

Marcando le due sonde (una per ciascun nucleotide) con due fluorocromi diversi è possibile discriminare contemporaneamente la presenza o l'assenza dei due alleli.

La specificità di tali sonde permette infatti che solo al perfetto allineamento fra sonda e filamento corrisponda poi un segnale di fluorescenza, nel caso di mismatch (una base diversa fra DNA stampo e sonda), l'amplificazione non avviene o è fortemente inibita con conseguente minore rilascio di fluorescenza. (Istituto Sperimentale "Lazzaro Spallanzani", 2005)

Alla fine del ciclo di amplificazione, un apposito software identifica le componenti dei marcatori e determina il contributo di ciascun marcatore permettendo di individuare il genotipo.



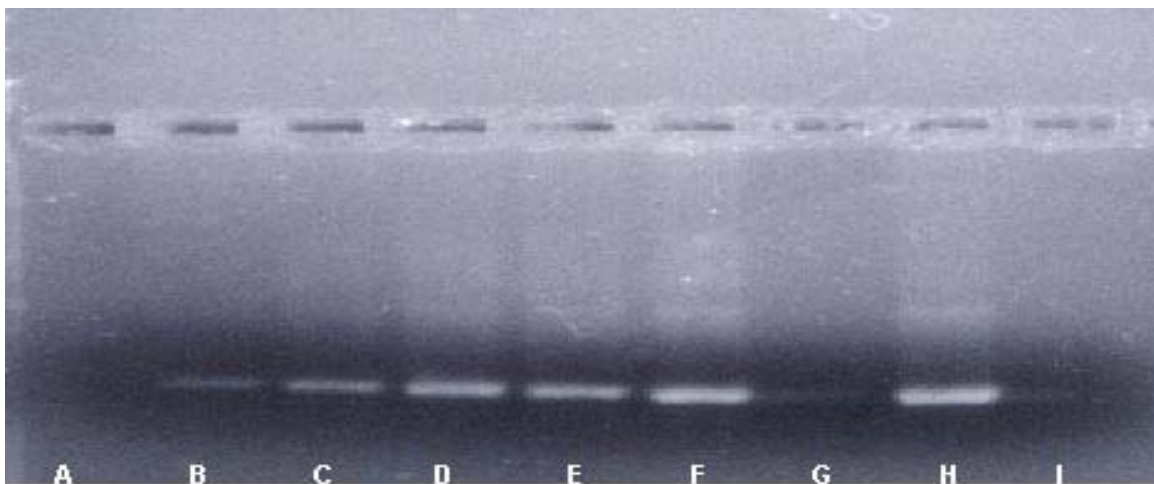
Il risultato di questa lettura è la classificazione dei campioni in due categorie: omozigoti ed eterozigoti. (Istituto Sperimentale “Lazzaro Spallanzani”, 2005)

Nel caso di specie, ossia la verifica dell'avvenuto sessaggio del seme, all' Istituto Spallanzani, sono stati disegnati, mediante un software, i *primers* e il *probe* sul gene PLP specifico del cromosoma X e sul gene BRY specifico del cromosoma Y.

E' stato poi allestito uno standard per la retta di taratura del dosaggio dei campioni, costituito da due plasmidi miscelati in un rapporto di 1:1 contenenti uno l'amplicone X e l'altro l'amplicone Y.

Lo standard è stato sottoposto a quattro diluizioni scalari a fattore 10, in modo tale da coprire interamente il possibile *range* di concentrazione del campione da testare.

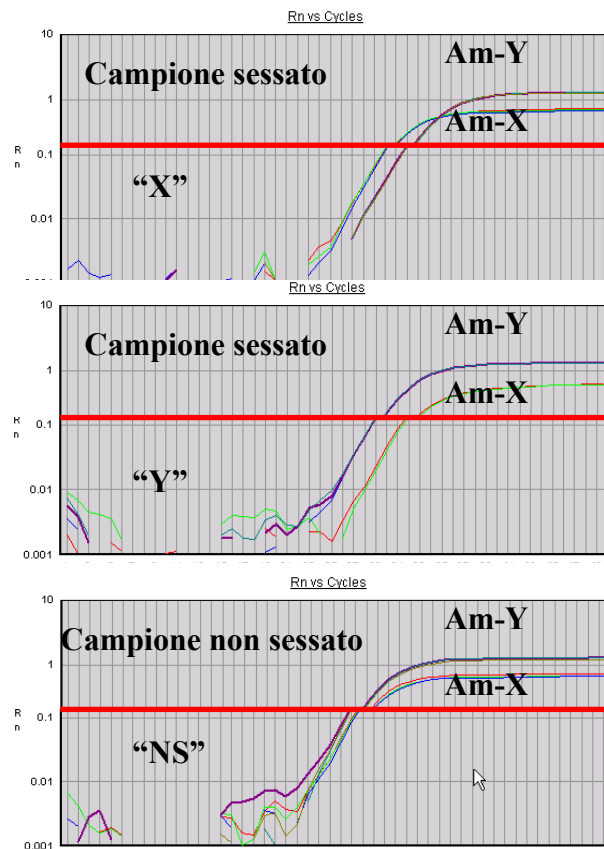
I dati ottenuti dall'amplificazione dello standard con le due coppie di *primers* e di *probes* sono stati usati per generare due plot di regressione log-lineare (tra il log delle percentuali di diluizione e i cicli soglia -Ct-). Questi hanno evidenziato un simile coefficiente angolare e un elevato coefficiente di correlazione lineare ($r = 0.99$).



- A. DNA da sangue femmina
- B. DNA da sangue femmina + DNA da pool di seme (arricchimento Y del 10%)
- C. DNA da sangue femmina + DNA da pool di seme (arricchimento Y del 20%)
- D. DNA da sangue femmina + DNA da pool di seme (arricchimento Y del 30%)
- E. DNA da sangue femmina + DNA da pool di seme (arricchimento Y del 40%)
- F. DNA da pool di seme (50% Y)
- G. DNA da seme sortato X
- H. DNA da seme sortato Y
- I. controllo negativo (acqua)

La misura delle percentuali di spermatozoi X e Y presenti in un campione di seme si ricava dal rapporto fra le quantità espresse come percentuali di diluizione ottenute dalle rispettive curve di taratura. (A. Galli, 2003)

AMPLILOT

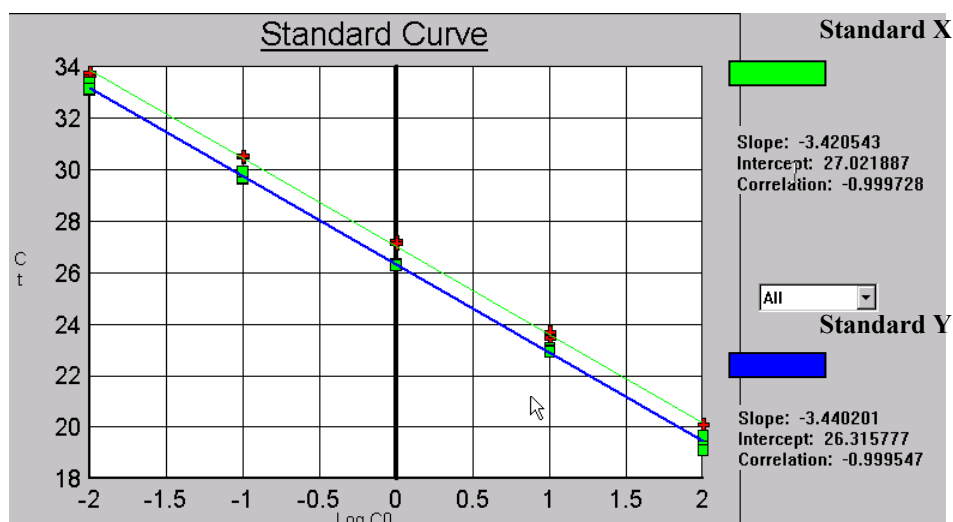


Il protocollo è stato validato allestendo le seguenti prove:

- Prova di ripetibilità (Ct): sono sufficienti due valori di Ct per ottenere una ripetibilità superiore al 99%.

- Prova di ripetibilità e riproducibilità della misura (pY) a differenti diluizioni di uno stesso campione: per ciascuna delle diluizioni è stato calcolato il *range* dei coefficienti di variazione intra-assay (range CV: 2.22 – 2.92%) e inter-assay (range CV: 2.39 – 2.77%) fra i quali non esiste differenza significativa.
- Prova di accuratezza della misura (pY): è stata confrontata la media di 20 misure (pY) di un campione di DNA estratto da bulbo pilifero di toro e il valore atteso μ :50%. L'accuratezza è risultata essere del 98.88%.

RETTE STANDARD



La metodica sviluppata in Real Time PCR si è rivelata una tecnica oggettiva in quanto accurata e riproducibile risultando un insostituibile strumento di supporto a tutte le strutture impegnate e/o interessate al sessaggio del seme. (A. Galli, 2003)

CAPITOLO 4

LINEE GUIDA PER IL CORRETTO UTILIZZO DEL SEME SESSATO

Il seme sessato è diverso dal seme convenzionale avendo una concentrazione di spermatozoi inferiore (www.zorlesco.it), il successo di gravidanza è una questione di attenzione, pianificazione, scelta dell'animale e scongelamento del seme. (Smusiani, 2008)

Il successo della fecondazione artificiale, e in particolare quella effettuata con seme sessato, è strettamente legato ad una buona pianificazione aziendale, ad un'adeguata gestione degli animali e ad un'attenta preparazione del seme.

I risultati ottenibili dal programma riproduttivo sono legati all'attenzione che si pone ai piccoli dettagli quotidiani. (www.superbrown.it)



SCELTA DEGLI ANIMALI PIU' ADATTI

La preparazione del seme sessato comporta particolari trattamenti sugli spermatozoi: per questo motivo esso ha una capacità fecondante limitata rispetto al seme convenzionale.

Il seme sessato quindi è ideale per le manze, in quanto la fertilità delle bovine si riduce progressivamente ad ogni parto. Per questo motivo si deve dare preferenza al suo uso nel seguente ordine: manze → primipare → secondipare → terzipare → ecc...

Per un'ottima riuscita dell'inseminazione si dovrebbero fecondare solo manze in ottime condizioni. Un buon indice di riferimento può essere la conferma che la manza ha raggiunto il 60% del suo peso stimato da adulta, entro 14 mesi di età, con un indice corporeo (BCS, body condition score) buono.

Inoltre sarebbe corretto inseminare la manza tra le 8 e le 12 ore dopo il rilevamento del calore (secondo il criterio mattina/sera), solo se le manifestazioni sono ben evidenti. (www.zorlesco.it)

In ogni caso il seme sessato può essere utilizzato anche con le vacche, verificando la loro funzionalità ginecologica dopo il parto e controllando che la bovina sia ciclica con calori manifesti: ottimale è intervenire su calore naturale.

Per scegliere il tempo di parto-concepimento migliore per l'atto inseminativo si suggerisce di applicare il semplice calcolo moltiplicando la produzione massima quotidiana per due (es: 45 litri = non prima di 90 giorni dal parto).

Dobbiamo inoltre essere selettivi: le vacche che presentano mastiti, aborti, zoppie o che non sono in perfetto stato di salute ginecologica non dovrebbero essere sottoposte all'inseminazione con il seme sessato. (Smusiani, 2008)

MOMENTO DELLA FECONDAZIONE

- **OSSERVAZIONE DEL CALORE** : osservare le manze / vacche almeno tre volte al giorno per un minimo di 15 minuti, soprattutto tra il momento della mungitura e dell'alimentazione, ricordando che molte vacche possono mostrare brevi momenti di calore manifesto.

Ottimale è la rilevazione del calore serale.

Altri segnali dell'estro, ad esempio montarsi e muggire, possono essere meno affidabili dei segnali del calore. L'utilizzo del seme sessato in questi soggetti è sconsigliato.

Gli aiuti per rilevare il calore, come ad esempio podometri, heath watch e/o colore sulla coda, sono molto utili per incrementare la sua individuazione.

Inoltre, anche la misurazione della concentrazione di progesterone nel latte, può essere un

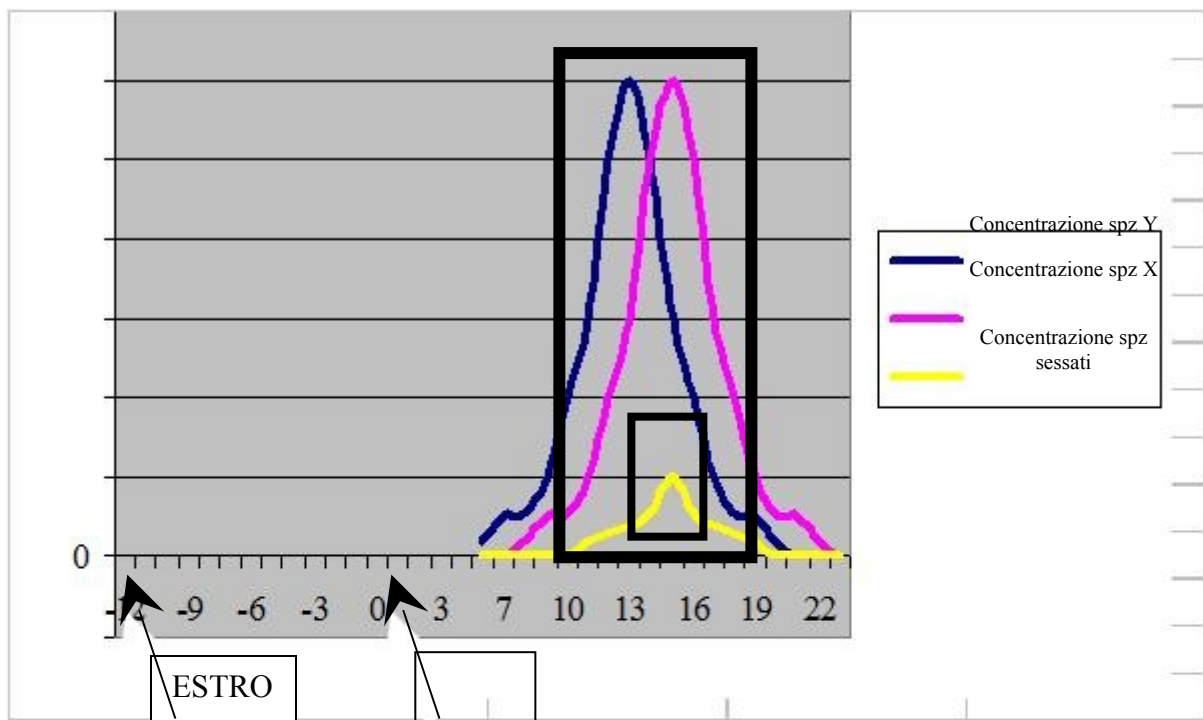


3)

- **PERIODO DELL'INSEMINAZIONE:** durante questo periodo si dovrebbe assicurare all'animale ambienti liberi da stress.

Per avere i migliori risultati l'intervento di inseminazione si deve effettuare circa 12 ore dopo l'inizio dell'estro. (Smusiani, 2008)

L'anticipo come ovvio, ma anche il ritardo dell'intervento portano a drastiche riduzioni della fertilità, come evidenziato nel grafico seguente:



[Concentrazione di spermatozoi a livello delle tube in relazione al numero di nemaspermici contenuti nella dose inseminante e al tempo trascorso dall'intervento fecondativo. (Cogent, Manuale d'impiego, 2003)]

Nel grafico si osserva il momento in cui è massima la concentrazione di spermatozoi nelle salpingi in relazione al numero di ore trascorse dopo la fecondazione (FA ore 0). Gli spermatozoi maschili hanno una massima concentrazione fra le ore 10 e 16 dopo la fecondazione e gli spermatozoi femminili fra le ore 13 e 19, mentre per gli spermatozoi

sessati si evidenzia come questo intervallo sia ristretto: fra le 14 e le 16 ore (intervallo di sole 2 ore).

Questa differenza è esclusivamente attribuibile al ridotto numero di nemaspermi contenuto nelle dosi di seme sessato.

Impiegando seme a concentrazione normale, già dopo 10 ore (per gli Y) e 12 ore (per gli X) dalla fecondazione si raggiunge un numero di circa quattro milioni di spermatozoi a livello della salpinge, ritenuto sufficiente a garantire tassi normali di concepimento, numero che non scende sotto questo valore per le successive 6 ore.

Questo consente una maggiore elasticità temporale nell'esecuzione della FA rispetto al momento ottimale dell'intervento.

Nel caso invece degli spermatozoi sessati, il loro numero ridotto comporta una loro presenza utile a livello salpingeo in tempi molto più ristretti, comportando la necessità di scegliere il momento ottimale in modo più rigoroso. Inoltre il numero di spermatozoi a livello della salpinge non raggiunge mai valori elevati con conseguente difficoltà ad ottenere ottimi tassi di concepimento.

Il seme sessato, inoltre, non è consigliato all'interno di programmi di fecondazione basati sulla sincronizzazione degli animali seguita da inseminazione ad orario fisso, senza la ricerca visiva del calore. (www.zorlesco.it)

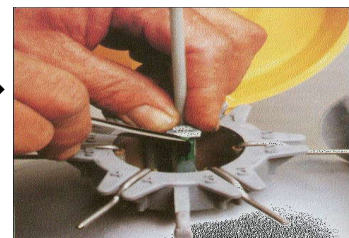
Infine, all'atto inseminativo le bovine devono essere bloccate in un'area apposita, delimitata, tranquilla, sempre in coppia o a piccoli gruppi per prevenire situazioni di paura e quindi di stress. (Smusiani, 2008)

MANIPOLARE IL SEME SESSATO

Le elevate performance produttive dipendono dalla cura dei dettagli. Dai risultati aziendali si è chiaramente dimostrato che applicando le seguenti semplici procedure si ottengono i migliori indici di gravidanza possibili. (Smusiani, 2008)

- **MANIPOLAZIONE DELLE PAILLETTES:**

- usare delle pinze, mai le mani, per maneggiare le paillettes; →



- non estrarre mai una paillette singola solo per guardarla e poi riposarla, si stresserebbe troppo;



- usare delle etichette per identificare le paillettes; →
- minimizzare il tempo in cui il *canister* rimane a un livello di azoto liquido basso, mentre si stanno spostando delle paillettes per essere usate. Bisognerebbe impiegare non più di 5 secondi (se si necessita invece di più tempo, re-immersione il *canister* nell'azoto liquido per almeno 10 secondi prima di ricominciare) →

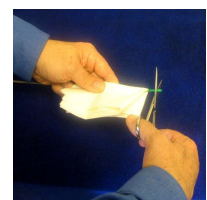


- **SCONGELARE LE PAILLETTES:**

- controllare la temperatura dell'acqua nel thermos con un termometro (verificare il termometro); →

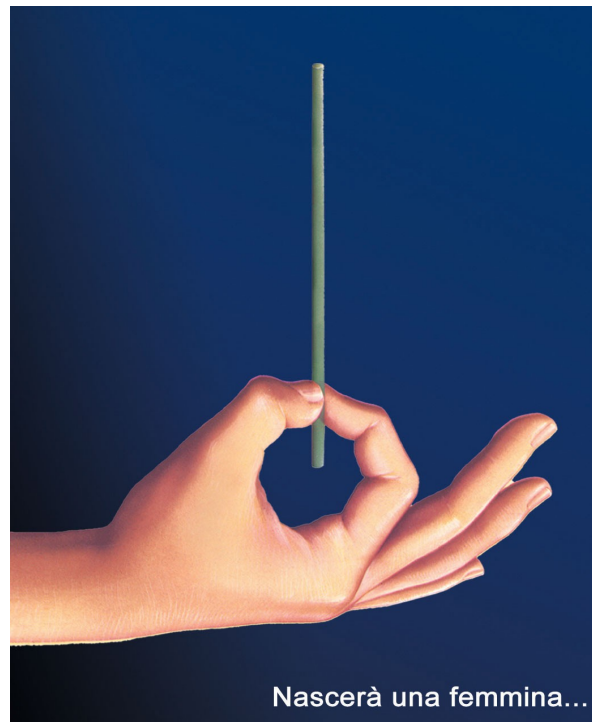


- estrarre solo la paillette che si desidera utilizzare;
- rimuovere dalla paillette ogni traccia di azoto;
- scongelare le paillettes una alla volta (lo scongelamento multiplo è quindi sconsigliato);
- scongelare immediatamente la paillette in un thermos, o ancora meglio in uno congelatore elettrico, alla temperatura di 37°C per almeno 40 secondi;
- scongelata la paillette non bisogna lasciarla nel thermos, ma utilizzarla al più presto (il seme dovrebbe essere usato entro 5 minuti dalla rimozione dal contenitore);
- asciugare accuratamente la paillette poiché l'acqua è spermicida;
- pre-riscaldare gli strumenti per la fecondazione artificiale e mantenerli in temperatura fino all'inseminazione (soprattutto durante la stagione fredda);
- usare un taglia-paillette o forbici affilate per tagliare il tappo di chiusura; →
- non dividere la paillette.



La paillette, infine, una volta scongelata non può essere ri-congelata. (Smusiani, 2008)

Il seme, in un contenitore ben protetto, si conserva per un periodo indefinito di tempo, purché completamente immerso in azoto liquido ad una temperatura di -196°C . (www.superbrown.it)



ALIMENTAZIONE E SALUTE

Per almeno un mese prima del periodo dell'inseminazione con il seme sessato, si deve preparare le manze e/o le vacche esenti da stress in condizioni sanitarie e nutritive ottimali. (Smusiani, 2008)

- **PERIODO DI PRE-INSEMINAZIONE - MANAGEMENT E ALIMENTAZIONE:** nel mese precedente la fecondazione occorre fare in modo che gli animali si abituino al gruppo (composto da un numero ristretto di capi) ed alla routine, non abbiano motivi di stress e siano in recupero di condizione corporea. (www.superbrown.it)

Le vacche con elevate performance produttive ed in bilancio energetico negativo, o che hanno perso peso, hanno meno probabilità di rimanere gravide!

Bisogna sottoporre gli animali ad una dieta bilanciata a livello energetico, proteico, minerale e vitaminico, e non cambiarla nel mese precedente e successivo all'inseminazione con seme sessato.

- **SALUTE RIPRODUTTIVA DI MANZE E VACCHE:** si dovrebbero ridurre le malattie conosciute che indeboliscono le prestazioni riproduttive, ad esempio la diarrea virale bovina

(BVD), leptospirosi, ecc., tramite una diagnosi precoce, trattamenti o prevenzione con vaccini.

Bisogna assicurarsi che dopo il parto la bovina abbia recuperato la normale attività ciclica e che l'utero sia pronto per un'ulteriore gravidanza, libero quindi da infezioni e/o danni. (Smusiani, 2008)

Si ricorda inoltre che le vacche con uno stato riproduttivo precario e con concomitanza di altre malattie, come mastiti e/o zoppie, è meno probabile che rimangano gravide. (www.superbrown.it)



Infine, è stato verificato che non è determinante compiere un'inseminazione profonda nel corno uterino, come non è necessario stabilire il lato dell'ovulazione, ma è sufficiente attenersi alla tecnica di deposizione del seme normalmente impiegato sia dai veterinari che dai tecnici operatori di fecondazione artificiale. (M.L. Sandionigi e G. Praderio, 2001-2003)

CAPITOLO 5

ECONOMIA E MERCATO DEL SEME BOVINO SESSATO

La diffusione dell'utilizzo di seme sessato, che rende disponibile un maggior numero di figlie femmine, consentirà agli allevatori di effettuare monte mirate, selezionando in azienda le bovine di qualità superiore.

Sul versante dei programmi di selezione, l'incremento delle figlie nate all'interno dei programmi di prova di progenie, permetterà di ottenere una più corretta valutazione genetica del toro. (R. Tabellini e G. Salza, 2008)

Il processo di sessaggio per mezzo del citofluorimetro a flusso è progredito notevolmente dal suo inizio fino ad oggi. (deGraaf S.P. et al., 2009)

Solo nella specie bovina, però, la tecnologia ha raggiunto un livello di sviluppo sufficiente per consentire la sua applicazione a livello commerciale.

Il successo della tecnologia dipende principalmente dalla capacità fecondante degli spermatozoi presenti in una dose di seme sessato, in quanto è questo il fattore economicamente più rilevante.

Fino ad oggi, la fertilità è ancora variabile. Nuove tecniche di separazione vengono tutt'ora studiate e perfezionate, e saranno probabilmente in grado di migliorare i tassi di fertilità a seguito di inseminazione artificiale con seme sessato. (Rath D. et al., 2008)

Il mercato del materiale seminale bovino a livello mondiale risulta condizionato dalla sovrapposizione del valore genetico dei riproduttori, dalla elevata disponibilità di prodotto e dall'incremento delle organizzazioni che propongono seme di importazione proveniente anche da nazioni che in passato non avevano espresso una genetica competitiva.

La tendenza alla riduzione del prezzo medio di vendita risulta la logica conseguenza di un'offerta ormai stazionaria.

Per trovare nuovi sbocchi a livello internazionale, i centri di produzione stanno tutt'ora attuando nuove strategie di investimento, orientate a fornire risposte coerenti con le esigenze degli allevatori e a potenziare lo sviluppo e la ricerca, come quella genomica, per identificare i soggetti miglioratori in tempi brevi già a livello di laboratorio, e il sessaggio del seme.

Anche sul mercato nazionale si assiste alla crescita di interesse per il seme sessato, alla base del quale si pongono le esigenze economiche delle aziende zootecniche che potranno mantenere in azienda le femmine di maggiore valore genetico, destinando le altre bovine agli incroci con razze da carne per ottenere vitelli da ingrasso più idonei alla filiera della trasformazione e quindi più remunerati dal mercato.

L'aumento delle femmine rappresenta, inoltre, un valido strumento da utilizzare nei programmi di salvataggio delle razze autoctone a limitata diffusione. (R. Tabellini e G. Salza, 2008)

Il costo unitario dello sperma sessato è un fattore determinante per la sua diffusione, per questo la politica dei prezzi dei fornitori è a sua volta molto importante per stabilire l'utilizzo totale di tale prodotto. (Franks JR et al., 2003)

Inoltre le attrezzature necessarie per il sessaggio sono al momento molto costose, nell'ordine di 300.000 dollari (circa 205.300 euro) per macchina. (Seidel GE Jr, 2003)

I recenti miglioramenti della procedura di sessaggio hanno ridotto i problemi causati dal seme sessato, che, insieme con i miglioramenti del processo di crioconservazione, hanno diminuito il costo unitario di produzione di una dose di sperma sessato e ha alzato il livello di fertilità. (Seidel GE Jr, 2003). Questi progressi tecnologici possono quindi trasformarsi in prezzi più bassi per gli allevatori. (Franks JR et al., 2003)

La commercializzazione del seme risulta ancora notevolmente frazionata; la concorrenzialità e la ricerca di nuovi spazi di mercato hanno portato a una politica di abbassamento dei prezzi.

Nell'ambito del libro genealogico della razza Frisona, ad esempio, già da diversi anni è in atto la tendenza ad un progressivo incremento di utilizzo di seme di importazione a discapito di quello nazionale ed una forte riduzione del prezzo medio di vendita del seme di produzione italiana.

La riduzione di prezzo è imputabile alla svalutazione del dollaro sull'euro, che ha influito in modo negativo anche sulle esportazioni, e alla forte competizione fra i centri. (Tabellini R. e Salza G., 2008)

COMMERCIALIZZAZIONE IN ITALIA

L' 80% della zootecnia bovina italiana si concentra in 11 province del nord e nelle regioni Lombardia, Emilia-Romagna, Veneto e Piemonte.

Il 30% del mercato italiano di seme è in mano a società estere, anche extraeuropee, che per la distribuzione in Italia si avvalgono di recapiti ad esse collegate, spesso con contratti di esclusiva.

I principali centri italiani di produzione del materiale seminale sono:

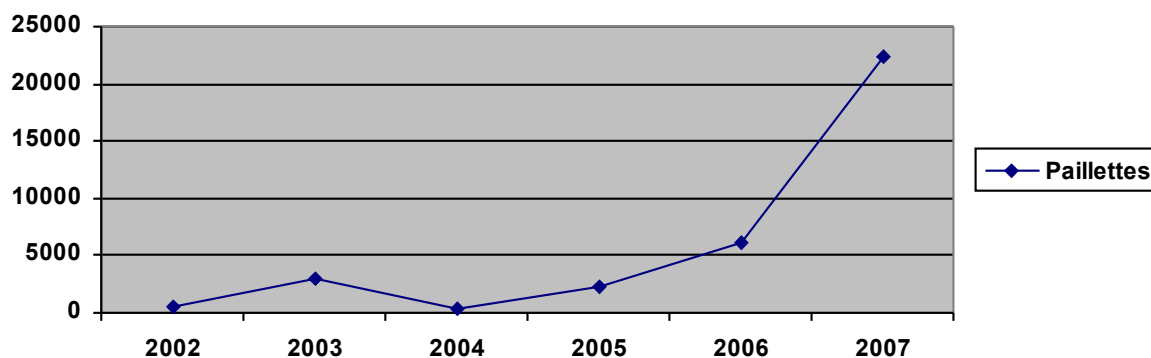
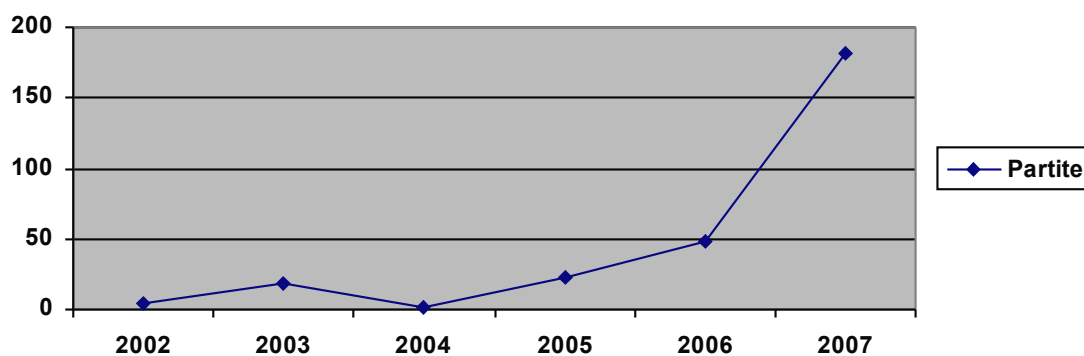
- l' Ente Lombardo Potenziamento Zootecnico (Elpzoo S.p.A.), con sede in Lombardia;
- l' Istituto Internazionale per i Miglioramenti del Patrimonio Zootecnico (Intermizoo S.p.A.), in Veneto;
- il Consorzio per l' Incremento Zootecnico (C.I.Z. Srl), con sede in Toscana;
- Semenitaly S.p.A., in Emilia-Romagna.

I centri italiani provano il 65% dei tori frisoni, con un investimento annuale di oltre 10.000.000 euro, che per i soli programmi genetici si possono quantificare in 30.000 euro per ogni toro messo in prova; mediamente un toro su 25 risulta interessante per la commercializzazione. (Tabellini R. e Salza G., 2008)

Utilizzando i dati del Controllo Ufficiale del Seme, è possibile fare un quadro aggiornato, al 2007, della situazione attuale e come si è evoluta negli anni.

Nella seguente tabella sono riportati il numero delle partite e delle paillettes distribuite in Italia dal 2002, anno di comparsa nel mercato nazionale di questo prodotto.

Anno	Partite	Paillettes
2002	4	500
2003	18	3050
2004	2	338
2005	23	2248
2006	48	6039
2007	181	22301
TOTALE	276	34476



Dall'analisi dei dati annuali si evidenzia, con l'esclusione dell'anno 2004 in forte controtendenza, un chiaro trend positivo! (Balduzzi, 2007)

Tutte queste considerazioni ci inducono a non avere nessun dubbio sulla strada da intraprendere, ma invece ci sono ancora alcuni aspetti da valutare bene prima di agire.

Il seme sessato costa di più di quello convenzionale (da 50 a 100 €) ed il processo di sessaggio "maltratta" gli spermatozoi che diventano un po' meno efficienti. (Frisanco G., 2008)

Rombo
Rombo Grille IT021000825566

Cellule basse

SEME SESSATO
Prezzo dose **65€**

Prezzo dose
20€

PRODUZIONE						
ITE	+783	Figlie	183	Allev.	169	Att. 90%
Latte	+383	Grasso	+0,14%	+26	Proteine	+0,13% +22
FUNZIONALITÀ						
Longevità	117	Cellule Somatiche	132			
Mungibilità	104	BCS	98			
MORFOLOGIA						
Ind. Punt. Finale	122			112	124	
Ind. Compl. Mammella	127					
Arti e Piedi	113					
Statura	107					
Forza vigore	107					
Profondità	116					
Angolosità	114					
Linea dorsale	76					
Angolo groppa	80					
Amp. strutt.	98					
Arti di lato	68					
Qual. garretto	94					
Pastoie	116					
Ait. tallone	117					
Mam. anteriore	109					
Larghezza post.	127					
Altezza post.	128					
Legamento	131					
Profondità	116					
Direz. cap.	120					
Capezoli lung.	81					

Superbro

Superbrown Eve Vin Rombo aAa 453621 K-BB
IT01SO 0129800 Even x Vinos x Emory

wn, 2007

QUAL E' IL RITORNO DEGLI INVESTIMENTI (ROI) PER IL SEME SESSATO?

Il ROI (Return of Investiment) di questo processo riproduttivo dipende da un'interazione complessa tra:

- ✓ la iniziale percentuale di concepimento con seme non sessato
- ✓ la riduzione di percentuale nel concepimento (se c'è) determinato dall'uso di seme sessato
- ✓ la differenza di prezzo tra seme sessato e seme convenzionale
- ✓ le aspettative di rapporto maschi : femmine per il seme sessato rispetto al convenzionale
- ✓ la differenza di valore tra tori e giovenche

Molti di questi fattori possono cambiare in modo considerevole da mandria a mandria, che influiscono diversamente sul punto di pareggio di seme sessato per ogni specifico riproduttore.

Per calcolare il ROI si è recentemente sviluppato un sistema di calcolo per il seme sessato in formato Microsoft Excel, che incorpora più di 20 diverse variabili che possono cambiare in base alla mandria. Questo sistema può essere d'aiuto nel determinare come questa nuova opportunità può essere usata al meglio in ogni specifica operazione.

Basandosi sul prodotto disponibile oggi, il miglior ROI può essere raggiunto limitando questo prodotto solo alle manze e seguendo “le linee guida per il corretto uso del seme sessato” (cap. 4, pag 33-8) per assicurare un'ottima probabilità di concepimento. (Thorbahn D., 2008)

CONCLUSIONI

Nell'ambito della metodica di separazione degli spermatozoi si sono compiuti importanti progressi, sia nella procedura di sessaggio che nello studio del miglior modo di utilizzo del seme.

I vantaggi dell'uso di sperma sessato si possono quindi riassumere in questi punti:

- ottenere quasi solo femmine, come risultato della fecondazione artificiale (fino a circa il 90%);
- avere prole femminile dai capi più interessanti a livello di produzione e di genetica;
- avere parti più facili che, specialmente sulle manze, implicano meno costi veterinari, meno perdita di produzione, meno problemi successivi di fertilità;

- più garanzie di avere sufficiente rimonta interna, senza dover acquistare bovine al di fuori dell'azienda, quindi assicurando anche maggiore biosicurezza;
- possibilità di usare tori da carne sulle vacche considerate "peggiori".

PIU' FEMMINE DALLE MANZE	=	PIU' REDDITO e PIU' PROGRESSO GENETICO
PARTI PIU' FACILI	=	MENO SPESE SANITARIE
MENO MASCHI	=	MENO MANCATO REDDITO
PIU' VITELLI DA INCROCIO	=	PIU' REDDITO
DAL SEME SESSATO → PIU' REDDITO AZIENDALE		

Tutte queste considerazioni portano sicuramente il consumatore a non avere dubbi sull'uso di tale prodotto, ma ci sono ancora alcuni aspetti da valutare bene, come il fatto che il processo di sessaggio attuale è eccessivamente invasivo, arrivando a "maltrattare" gli spermatozoi, che quindi risultano meno vitali, e, non meno importante, il costo elevato delle dosi di seme sessato, che arriva ad essere addirittura tre volte superiore a quello del seme convenzionale.

Allo stato attuale della ricerca, tali ostacoli, inclusa la lentezza del procedimento e la notevole perdita di spermatozoi, sono insuperabili, essendo strettamente connessi al meccanismo di sessaggio.

Su altri limiti, invece, si può intervenire sviluppando nuove strategie di riproduzione adatte specificatamente all'utilizzo di seme sessato.

Da quanto detto nell'elaborato, si può quindi affermare che seguendo precise e determinate procedure di fecondazione, è possibile migliorare alcuni aspetti legati all'uso in campo di questo prodotto.

Tali metodi sono attribuibili, ad esempio, all'utilizzo di seme sessato più sulle manze che sulle vacche e al tempo di fecondazione che non deve superare le 12 ore dopo l'inizio dell'estro.

Certo la possibilità di ottenere una prole interamente femminile, farebbe gola a qualsiasi allevatore, ma questo non deve permettere di sorvolare su importanti vincoli, che comparati al costo delle dosi e della manodopera, sono sicuramente motivo di ripensamenti.

Tali considerazione fanno giungere ad un'unica valida conclusione: il seme sessato sarà utilizzato in larga scala nella specie bovina solo quando il miglioramento della produzione e/o dell'efficienza della procedura sarà in grado di compensare i costi aggiuntivi per l'acquisto di sperma sessato!

BIBLIOGRAFIA

1. Bacchiocchi C.; “Le nuove frontiere della FA – Il seme bovino sessato, benefici e limitazioni”, Gen 2009, tratto da *www.buiatria.it*
2. Balduzzi; “Seme bovino sessato in Italia”, Il Controllo Ufficiale del Seme, 2007, pg 99-100
3. Bulletti C.; “Il laboratorio di andrologia per le tecniche PMA”, Gen 1997, tratto da *www.carlobulletti.com*, pg 6-7
4. Crescentini F.; “La citofluorimetria a flusso consente l'analisi automatica di sospensioni cellulari monodisperse, misurandone le caratteristiche fisiche e/o biochimiche”, 2004, tratto da *www.dipbsf.uninsubria.it*

5. Cross N.L.; “Role of cholesterol in sperm capacitation”, *Biology of Reproduction*, Jul 1998, vol. 59 (1), pg 7-11
6. Davis B.K., Byrne R., Hungund B.; “Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumine during capacitation in vitro”, *Biochimica et Biophysica acta*, Dic 1979, vol. 558 (3), pg 257-66
7. DeGraaf S.P., Beilby K.H., Underwood S.L., Evans G., Maxwell W.M.; “Sperm sexing in sheep and cattle: the exception and the rule”, *Theriogenology*, Gen 2009, vol. 71 (1), pg 89-97
8. Ericsson R.J. et al.; “ Sex selection via albumin columns: 20 years of results”, *Human Reproduction*, Oct 1994, vol. 9 (10), pg 1787-8
9. Franks J.R., Telford D.J., Beard A.P.; “Uptake of sexed semen by UK suckler beef producers”, *Livestock Production Science*, 2003
10. Frijters A.C., Mullaart E., Roelofs R.M., van Hoorne R.P., Moreno O., Merton J.S.; “What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process?”, *Theriogenology*, Gen 2009, vol. 71 (1), pg 64-7
11. Frisanco G.; “Seme sessato significa più vitelle”, 2008, tratto da *www.superbrown.it*
12. Galli A., Balduzzi D.; “Legislazione ed inseminazione artificiale animale”, *Atti 2 Congresso Nazionale SIRA*, Grugliasco (TO), pg 31-38, 2004
13. Galli A., Balduzzi D., Signori T.; “Semen analysis is by flow cytometry: an useful tool to evaluate fertility capacities”, *Theriogenology*, 2004
14. Galli A., Balduzzi D., Vanni R., Puglisi R., Parati K.; “La biologia moderna nelle tematiche di controllo e di sessaggio del seme bovino”, *Istituto Sperimentale “Lazzaro Spallanzani” – Società Agraria di Lombardia – Milano*, Ott 2003, pg 1-13

15. Garner D.L., Seidel G.E. Jr; “History of commercializing sexed semen for cattle”, *Theriogenology*, Apr 2008, vol. 69 (7), pg 886-95
16. Gellert – Mortimer S.T., Clarke G.N., Baker H.W., Hyne R.V., Johnston W.I.; “Evaluation of Nycodenz and Percoll density gradients for the selection of motile human spermatozoa”, *Fertility and Sterility*, Feb 1988, vol. 49 (2), pg 335-41
17. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.; “La fecondazione in vitro”, *Caleidoscopio Italian*, Mag 1988
18. Istituto Sperimentale “Lazzaro Spallanzani”; “Controllo genetico dell’etichettatura ordinaria nella filiera della carne bovina”, 2005, pg 13-17
19. Johnson L.A., Flook J.P., Hawk H.W.; “Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting”, *Biology of Reproduction*, Ago 1989, vol. 41 (2), pg 199-203
20. Lentini G.M.; “Preparazione del seme – Tecnica di Percoll”, Feb 2009, tratto da www.fecondazioneassistita.it
21. Rath D., Johnson L.A.; “Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen”, *Reproduction in domestic animals*, Lug 2008, vol. 43, pg 338-46
22. Rose G.A., Wong A.; “Experiences in Hong Kong with the theory and practice of the albumin column method of sperm separation for sex selection”, *Human Reproduction*, Gen 1998, vol. 13 (1), pg 146-9
23. Sandionigi M.L., Praderio G.; “Verifica applicativa dell’impiego di seme sessato nelle bovine da latte”, Regione Lombardia, 2001-2003, tratto da www.agricoltura.regione.lombardia.it
24. Sbracia M., Sayme N., Grasso J., Vique L., Huszar G.; “Sperm function and choice of preparation media: comparison of Percoll and Accudenz discontinuos density gradients”, *Journal of Andrology*, Gen-Feb 1996, vol. 17 (1), pg 61-7

25. Schillaci R.; “Procreazione medicalmente assistita: tecniche di I° livello”, 2000, tratto da *www.sismpa.it*
26. Seidel G.E. Jr; “Economics of selection for sex: the most important genetic trait”, *Theriogenology*, 2003, vol. 59, pg 585-598
27. Seidel G.E. Jr; “Sexing mammalian sperm – Intertwining of commerce, technology, and biology”, *Animal Reproduction Science*, Dic 2003, vol. 79 (3-4), pg 145-56
28. Smusiani; “Seme sessato Jersey – Ottenere il meglio con il seme sessato”, Viking Genetics, Ott 2008
29. Steeno O., Adimoelja A., Steeno J.; “Separation of X- and Y-bearing human spermatozoa with the Sephadex gel-filtration method”, *Andrologia*, 1975, vol. 7 (2), pg 95-7
30. Suzuki F., Yanagimachi R.; “Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa”, *Gamete Research*, Lug 1989, vol. 23 (3), pg 335-47
31. Tabellini R., Salza G.; “Analisi di mercato – Seme bovino, più ricerca per essere competitivi”, *Agricoltura*, Feb 2008, pg 36-38
32. Tamburrini A.; “Sviluppo della sessualità umana”, CEPIC: Centro Europeo Psicologia Investigazione Criminologia, Mar 2003, pg 2
33. Thorbahn D.; “Sexed semen: is it finally a reality?”, *The dairy site*, Apr 2008

SITOGRAFIA

1. www.intermizoo.it
2. www.molecularlab.it
3. www.pacifi-net.it

4. www.superbrown.it
5. www.units.it
6. www.wikipedia.it
7. www.zorlesco.it