Biotecnologie della riproduzione

Uno degli obiettivi principali delle biotecnologie applicate alla acquacoltura è quello di migliorare e/o aumentare le produzioni negli allevamenti, cercando naturalmente di ridurne i costi.

Biotecnologie applicate alla riproduzione in acquacoltura

DISFUNZIONI RIPRODUTTIVE

COLTURE MONOSESSO ⟶ Feminilizzazione
Mascolinizzazione
Triploidizzazione

SELEZIONE E GESTIONE DEI RIPRODUTTORI

PRINCIPALI DISFUNZIONI RIPRODUTTIVE NEI PESCI ALLEVATI

Quasi tutte le specie ittiche allevate in cattività esibiscono alcune forme di disfunzioni riproduttive. Tali disfunzioni sono probabilmente causate dalla combinazione degli stress indotti dalla cattività e dalla mancanza delle appropriate condizioni ambientali necessarie per la riproduzione.

Le femmine in cattività subiscono più comunemente il fallimento della FOM e quindi dell'ovulazione e della deposizione, mentre i maschi producono piccoli volumi di sperma o gameti di bassa qualità.

- La manipolazione dei vari parametri ambientali come: temperatura, fotoperiodo, salinità, volume e profondità delle vasche etc. possono in alcuni casi incrementare il successo della deposizione.

- In alcune specie i trattamenti ormonali sono l'unico modo per indurre la riproduzione in cattività.

- I problemi riproduttivi spesso diminuiscono con il tempo dopo che molte generazioni sono state prodotte ed allevate, come nel caso dell'orata.

- Negli anni '70 quando iniziò il suo allevamento, l'unico modo per ottenere una ragionevole quantità d'uova era la somministrazione d'ormoni esogeni.
- Oggi l'orata depone spontaneamente in cattività per tre mesi durante la naturale stagione di deposizione, i trattamenti ormonali sono utilizzati solo negli individui che non rispondono al condizionamento termico e del fotoperiodo

Le disfunzioni riproduttive sono di solito più serie nelle femmine e possono essere classificate in tre tipi:

1) Il completo fallimento della vitellogenesi o della spermatogenesi;

2) l'assenza della FOM;

3) il fallimento della deposizione

Il completo fallimento della vitellogenesi

Questo è il caso dell'*Anguilla anguilla* le cui gonadi in cattività non sviluppano poichè in natura lo sviluppo gonadale avviene durante la migrazione verso il Mar dei Sargassi dove poi si verifica la maturazione gonadale e la deposizione.

Altre specie che esibiscono simili problemi sono la *Seriola dumerili* e il *Mugil cephalus*.

Il completo fallimento della vitellogenesi

In queste specie, infatti, la vitellogenesi è arrestata ai primi stadi, in particolare solo un limitato numero di femmine inizia la vitellogenesi e produce però oociti di diametro non superiore a 200-300 µm, questi oociti sono assolutamente troppo immaturi perchè siano indotti a completare la maturazione ed ad essere ovulati.

Tali oociti divengono atretici e sono riassorbiti alla fine della stagione riproduttiva

l'assenza della FOM

Il secondo tipo di disfunzione nelle femmine è l'assenza della FOM.

In questo caso la vitellogenesi sembra progredire normalmente, ma al sopraggiungere della stagione riproduttiva, gli oociti post-vitellogenici non subiscono la FOM, l'ovulazione e divengono atretici.

Questo è il più comune problema riproduttivo incontrato in acquacoltura e verso il quale è indirizzata maggiormente la ricerca

il fallimento della deposizione

Il terzo tipo di disfunzione nelle femmine è il fallimento della deposizione. Nelle specie che esibiscono questo problema la vitellogenesi, la FOM, e l'ovulazione avviene normalmente come risposta dei normali stimoli fisiologici ed ambientali, ma le uova non sono rilasciate in acqua. Queste uova possono avere due destini:

- o sono ritenute nella cavità addominale per essere poi riassorbite nei mesi successivi, come nei salmonidi,
- oppure sono rilasciate molto più tardi (da ore a giorni) senza alcuna finalità riproduttiva, come nel caso del *Morone saxatilis* ed il *Dentex dentex*

Chiaramente in queste specie le uova possono essere spremute manualmente e fertilizzate artificialmente.

La spremitura deve però essere effettuata entro un preciso tempo dopo l'ovulazione, poichè un ritardo può comportare un'eccessiva maturazione delle uova ed il fallimento della fecondazione artificiale.

Tale periodo può durare settimane, ore o addirittura minuti e dipende della specie e dalla temperatura dell'acqua. Ad esempio a basse temperature nei salmonidi le uova sono ritenute nella cavità ovarica per almeno una settimana dopo l'ovulazione, senza alcuna diminuzione della qualità, invece nel *Morone saxatilis* l'eccessiva maturazione avviene in meno di un'ora

DCM

Le principali disfunzioni riproduttive osservate nei maschi allevati sono la riduzione della qualità e della quantità di sperma prodotto e la precocità sessuale.

Ad esempio *Salmo salar*, una specie di grande interesse commerciale nei paesi del nord, produce in cattività meno di 0.1 ml sperma per Kg di peso corporeo.

Questa esigua quantità di sperma chiaramente non è sufficiente per supportare le procedure d'inseminazione artificiale.

In aggiunta animali selvatici di questa specie catturati durante la stagione riproduttiva e posti in cattività, producono sperma con spermatozoi immobili, oppure d'elevata viscosità tanto da non consentire il mescolamento con l'acqua necessario per attivare gli spermatozoi.

- La precocità sessuale è un problema che riguarda in particolare i salmonidi ma anche specie marine come *Morone Saxatilis* e *Dicentrarchus labrax*. In queste specie la maturazione sessuale si può verificare un anno prima della naturale pubertà.
- Tale fenomeno è determinato sia da cause genetiche, che ambientali (disponibilità di cibo, densità di popolazione, temperatura etc..).
- Questo fenomeno è molto indesiderato dagli itticoltori, perchè in alcune specie la precoce maturità sessuale si ripercuote sullo sviluppo somatico. Infatti, secondo la teoria bioenergetica durante la maturazione sessuale, l'energia metabolica è deviata verso lo sviluppo gonadale a scapito di quello somatico. Ciò si traduce in una riduzione della taglia commerciale.

- Numerose ricerche sono state condotte per risolvere le disfunzioni riproduttive sopraccitate, ed i trattamenti con ormoni esogeni si sono rivelati tra le applicazioni più efficaci

- Perché!?

I TRATTAMENTI ORMONALI CONSENTONO

- AUMENTARE LA PRODUZIONE DI GAMETI
- OTTENERE PRODUZIONE DI GAMETI FUORI DELLA STAGIONE RIPRODUTTIVA
- INCREMENTARE L'EFFICIENZA DELLA RIPRODUZIONE MEDIANTE SINCRONIZZAZIONE DELL'OVULAZIONE E DELLA SPERMIAZIONE;
- MINIMIZZARE LE PERDITE DOVUTE ALLA MORTALITÀ PREDEPOSITORIA
- MASSIMIZZARE LA SOPRAVVIVENZA DELLA PROGENIE;
- PERMETTONO LA IBRIDAZIONE INTRASPECIFICA ED INTER SPECIFICA
- RICERCA

 SPECIE CHE NON SI RIPRODUCONO IN CATTIVITÀ

CONDIZIONI AMBIENTALI DIFFERENTI:

- NON MATURANO SPONTANEAMENTE IN CATTIVITÀ
- NON DEPONGONO IN CATTIVITÀ

 SPECIE CHE SI RIPRODUCONO IN CATTIVITÀ

- NON MATURANO SPONTANEAMENTE IN CATTIVITÀ
- Femmine falliscono la FOM, non ovulano o non depongono
- Maschi poco sperma e di bassa qualità

DISPONIBILITÀ QUALITATIVA E QUANTITATIVA DI GAMETI

Induzione ormonale della FOM e della deposizione (ovulazione e spermiazione)

Fino agli anni '70 le procedure utilizzate per indurre l'ovulazione e la spermiazione, si riferivano alle cosiddette tecniche della prima generazione o dell'ipofizzazione. Tali tecniche prevedevano la somministrazione d'omogenati di ghiandole pituitarie, provenienti da altri pesci sessualmente maturi.

Nelle tecnologie della seconda generazione sono stati utilizzati estratti di ghiandole pituitarie omologhe ed eterologhe, gonadotropine di pesce parzialmente purificate, e gonadotropina corionica umana.

Le tecnologie di III generazione hanno utilizzato il GnRH con o senza antagonisti della dopamina, come il domperidone ed il pimozide oppure accoppiato con antiestrogeni. Queste ultime tecniche hanno assunto sempre maggiore interesse, grazie alla scoperta di nuove isoforme del GnRH, alla produzione dei suoi derivati sintetici, e allo sviluppo di nuove modalità di somministrazione.

Utilizzo delle preparazioni gonadotropiniche: Ipofizzazione, estratti pituitari e HCG

- L'ipofizzazione, ossia l'uso d'omogenati ed estratti pituitari per indurre la deposizione nei pesci, è iniziata intorno agli anni '30.
- La raccolta delle ghiandole era eseguita sugli animali (femmine e maschi) durante il periodo riproduttivo.
- Le ghiandole pituitarie raccolte erano prima stoccate in alcool o disidratate in acetone, quindi omogenate in soluzione fisiologica per essere poi iniettate nell'animale. Inizialmente era utilizzato, a parità di peso, nei maschi un rapporto di un'ipofisi del donatore per ogni pesce ricevente, mentre nelle femmine il rapporto era di 1.5:1.
- Tale approccio però era a volte inefficace, a causa della non esatta correlazione tra peso e contenuto gonadotropico della pituitaria.

Le più recenti applicazioni del metodo dell'ipofizzazione, prevedono la somministrazione intramuscolare della dose totale pari a circa 2-10 mg/Kg di peso corporeo, suddivisa in due iniezioni. Nella prima, definita d'innesco, è iniettato circa il 20% della dose totale, la restante parte è iniettata dopo circa 12-24 h.

L'utilizzo delle preparazioni pituitarie in ogni caso è associato a numerosi svantaggi:

1) la concentrazione del LH (GTH) può essere molto variabile, inoltre ancor oggi tale concentrazione è specificata solo in un numero limitato di confezioni;
2) Il contenuto di LH durante la riproduzione è specie specifico;
3) esiste un elevato rischio di trasmissione di patologie dal donatore al ricevente.

In seguito al successo dell'uso degli estratti o preparazioni pituitarie e in considerazione anche dei problemi ad esso associati, molti sono gli sforzi diretti a purificare totalmente o parzialmente il LH.

La tecnica d'ipofizzazione, sebbene sia primitiva nel suo approccio è a tutt'oggi in uso, soprattutto nei paesi in via di sviluppo perchè poco costosa e di facile utilizzo

A causa dei problemi sopra citati, i ricercatori hanno iniziato ad utilizzare GtHs mammifero, in particolare l'hCG (gonadotropina corionica umana), purificata dalle urine delle donne nel primo trimeste di gravidanza, e che è disponibile come prodotto farmaceutico a basso costo e a titolo noto.

A differenza delle preparazioni di LH, l'hCG è spesso utilizzato in singole dosi, con concentrazioni che variano dalle 100 alle 4000 UI/KG di peso corporeo. I trattamenti con hCG sono stati efficaci nell'indurre l'ovulazione in diverse specie, come in *Rachycentron canadum*, in *Macquaria novemaculeata*, *Lutjanus argentimaculatus*, dove una singola dose (275-1500 UI/Kg peso corporeo) induce l'ovulazione d'oociti post-vitellogenici.

Come per altri trattamenti, la concentrazione di hCG necessaria per indurre la spermiazione è da due a quattro volte inferiore a quella richiesta nelle femmine.

L'hCG è stata efficace anche nell'indurre la spermatogenesi e la spermiazione nell'*Anguilla japonica*.

SVANTAGGI

Il principale svantaggio, spesso menzionato, ma non del tutto provato, associato all'utilizzo dell'hCG (così come per l'LH eterologo) è dovuto al fatto che essendo un peptide risulta immunogeno nei pesci.

Questo rende chiaramente inefficace il trattamento nella successiva stagione riproduttiva a causa della produzione d'anticorpi specifici.

Il trattamento con hCG è preferito al GnRH, nell'indurre la FOM, l'ovulazione e la spermiazione, in alcune circostanze dove è richiesta una risposta veloce.

Il vantaggio dell'hCG è che esso agisce direttamente a livello delle gonadi mentre il GnRH richiede di un lungo periodo per determinare una risposta.

Un eccessivo intervallo tra il trattamento e la deposizione può comportare una moria predepositoria, dovuta ad esempio allo stress della cattura di riproduttrici selvatiche o al trasporto delle stesse dall'esterno all'interno degli impianti.

In queste circostanze l'utilizzo dell'hCG è più appropriato poichè agisce più velocemente.

- ***Utilizzo dell'ormone rilasciante le gonadotropine e dei suoi agonisti***
  - In seguito alla scoperta dell'ormone ipotalamico (LHRH poi GnRH) i ricercatori hanno iniziato a sperimentare l'applicazione di questo nuovo ormone allo scopo di indurre la deposizione nei pesci allevati. Il trattamento con estratti ipotalamici o con GnRh nativo induceva in femmine mature di *Cyprinus carpio* il rilascio di GtH dalla pituitaria.

  - Con lo sviluppo poi del primo, potente agonista sintetico dello GnRH, che era di un ordine di grandezza più potente dello GnRH nativo, la sperimentazione si è spostata sull'utilizzo di vari agonisti sintetizzati

  - L'efficacia dello GnRH e dei suoi agonisti hanno confermato l'ipotesi che nei pesci che presentano disfunzioni riproduttive, la pituitaria è ancora capace di sintetizzare e rilasciare le gonadotropine endogene se propriamente sollecitata.

L'utilizzo dello GnRH, nell'induzione della deposizione, ha importanti vantaggi rispetto all'uso delle preparazioni gonadotropiniche:

1) IL GnRH ed i suoi agonisti sono piccoli peptidi che non determinano risposte immunitarie per cui possono essere usati nelle successive stagioni riproduttive;
2) IL GnRH inducendo il rilascio delle gonadotropine, ed agendo quindi ad un più alto livello dell'asse I-P-G, determina una più bilanciata stimolazione degli eventi ormonali;

Ciò dovrebbe determinare una migliore integrazione tra tali eventi e le altre funzioni fisiologiche, che influenzano sia direttamente sia indirettamente il rilascio degli altri ormoni necessari per il successo della FOM, della spermiazione e dell'ovulazione, come ad esempio la prolattina, l'ormone della crescita, e gli ormoni.

3) IL GnRH è ottenibile in forma pura per sintesi organica ad un costo contenuto, perciò i rischi di trasmissione delle patologie sono ridotti.

4) In fine grazie alla similitudine strutturale delle varie isoforme dello GnRH tra le varie specie, può essere applicato con successo, su svariate specie.

–Sebbene la somministrazione di GnRH nativo induce un immediato incremento in circolo delle gonadotropine, in molte specie però quest'incremento è di breve durata (emivita 5 minuti) e quantitativamente basso, in ogni caso insufficiente per indurre la FOM e la deposizione dei gameti.

– La breve emivita dello GnRH nativo è il risultato della veloce degradazione da parte delle endopeptidasi localizzate nella pituitaria, nel fegato e nei reni del pesce. Questi enzimi tagliano lo GnRH nativo tra le posizioni 5-6 e 9-10, formando dei piccoli frammenti senza alcuna attività.

–Per poter determinare una risposta efficace, lo GnRH nativo deve essere somministrato a dosi molto elevate, che comporta un altrettanto elevato costo economico. Per tale motivo si preferisce utilizzare analoghi di sintesi che presentano delle modificazioni a carico delle posizioni soggette all'azione delle endopeptidasi.

- Tali analoghi sono più resistenti, presentano una maggiore affinità per i recettori, un'emivita maggiore (23 minuti), ed una potenza secondo la specie, di 30-100 volte superiore.
- Dei molteplici derivati di sintesi dello GnRH, oggi disponibili, i più frequentemente usati per indurre la deposizione sono: il [D-Ala^6,Pro^9,Netilamide] mammalian GnRH ([D-Ala^6,Pro^9, Net]-mGnRH) ed il [D-Arg^6,Pro^9,Netilamide] salmon GnRH ([D-Arg^6,Pro^9, Net]-sGnRH).
- Il ([D-Ala^6,Pro^9, Net]-mGnRH è il derivato maggiormente usato nei pesci, poichè essendo utilizzato anche in medicina umana è di poco costosa e facile reperibilità..

- Gli antagonisti della dopamina (DA), sono spesso usati in combinazione con lo GnRH nell'induzione della deposizione.

- In tali terapie sono somministrate due dosi di GnRH ed una di DA, quest'ultima concomitante con la prima di GnRH. Tale strategia di trattamento sembra rimuovere l'inibizione dei gonadotropi e potenzia l'effetto stimolante della seconda iniezione di GnRH sul rilascio della gonadotropina.

- L'inibizione dopaminergica è stata dimostrata solo nei ciprinidi, mentre è assente nella maggior parte delle più importanti specie marine allevate. Recentemente sono stati esaminati anche gli inibitori dell'aromatasi (AI), per la loro potenzialità nell'indurre la FOM e la spermiazione. Nelle femmine d'*Oncorhynchus kisutch*, gli AI inibiscono la conversione nell'ovario, del T in E2 permettendo l'incremento della produzione di 17,20ß-P, necessario per l'induzione della FOM e dell'ovulazione.

- Nei maschi, dove non è stata identificata attività aromatasica nelle gonadi, l'induzione della spermiazione osservata dopo trattamento con l'AI è probabilmente legata alla stimolazione dell'asse GnRH-GtHs, grazie alla riduzione della conversione del T in E2 a carico delle posizioni soggette all'azione delle endopeptidasi.

"Sistemi a GnRHa a rilascio prolungato"

- In alcuni teleostei in allevamento, il picco di LH determinato dall'azione del'GnRH, è di breve durata e può non essere sufficiente per determinare l'ovulazione.
- Difatti in molte specie studiate tale durata è talmente breve che sono necessarie due iniezioni per indurre l'ovulazione. I trattamenti multipli che sono spesso necessari per una buona risposta, presentano però diversi problemi per gli allevatori:
- Primo, la continua manipolazione dei riproduttori richiede molto lavoro e tempo e quindi i costi maggiori;
- secondo, lo stress continuo può determinare atresia follicolare o cattiva qualità delle uova.

Per ovviare a questi problemi è stata recentemente elaborata una nuova generazione di "sistemi a rilascio prolungato" che hanno dato interessanti risultati su diverse specie ittiche come *Dicentrarchus labrax, Sparus auratus, Mugil cephalus, Pagrus africanus*

"Sistemi a GnRHa a rilascio prolungato"

I sistemi più efficaci sono costituiti da matrici biodegradabili a base di co-polimeri dell'acido lattico e dell'acido glicolico in forma di microsfere (LGA, 5-200 di diametro) o impianti solidi costituiti da polimeri dell'acetato d'etilene e vinile (EVAC), che rilasciano lentamente ed in modo continuo lo GnRHa contenuto nella matrice stimolando il rilascio continuo di GtH dall'ipofisi (per 2-5 settimane). La cinetica di rilascio può essere controllata variando il peso molecolare del co-polimero, la percentuale ed il tipo della matrice inerte.

Questi sistemi determinano quindi emissioni multiple nelle specie che hanno sviluppo sincrono degli oociti ed ovo-deposizione frazionata come *Dicentrarchus labrax*, nelle specie ad ovo- deposizione sincrona a gruppi, come l'ombrina, la cernia ed il morone ed in specie a deposizione asincrona come l'orata

"Sistemi a GnRHa a rilascio prolungato"

- I sistemi a rilascio prolungato di GnRHa sono stati efficaci anche nell'incrementare la produzione di sperma nei pesci, inoltre, presenta alcuni vantaggi rispetto all'uso di trattamenti acuti con preparazione di gonadotropine e GnRHa.

- Le singole iniezioni del trattamento spesso inducono una transiente elevazione della produzione del plasma seminale, con un basso incremento nel numero di spermatozoi (basso spermatocrito). Tale risultato è desiderabile solo quando a causa delle condizioni di cattività, l'animale produce sperma con uno spermatocrito molto elevato (>85 %).

"Sistemi a GnRHa a rilascio prolungato"

In ogni caso nella maggior parte dei casi un incremento del solo liquido seminale non costituisce un successo del trattamento ormonale. I sistemi a rilascio di GnRH determinano invece un incremento della produzione dello sperma senza alcuna diminuzione della densità, della motilità e della capacità fertilizzante.

- Il secondo e più serio problema nell'uso d'iniezioni, è che spesso stimolano un aumento della produzione di sperma solo per breve tempo, a differenza dei sistemi a rilascio prolungato

"Sistemi a GnRHa a rilascio prolungato"

- Sebbene i sistemi a GnRH (parzialmente anche le iniezioni) sono in grado di indurre la FOM, l'ovulazione e la deposizione nelle femmine, ed incrementano la produzione di sperma nei maschi, le terapie con GnRHa sono efficaci solo se la gametogenesi è in stadio avanzato, quindi tali trattamenti non sono in grado di risolvere le disfunzioni di primo tipo.

- Ciò dipende dal fatto che le cellule gonadotrope, diventano responsive allo GnRHa esogeno solo se sono già state esposte all'azione degli estrogeni follicolari nella femmina e agli androgeni 11-ossigenati nel maschio. In altri termini le cellule gonadotrope all'inizio della gametogenesi sono in grado di rispondere solo allo GnRH endogeno rilasciato nelle loro immediate vicinanze (alte concentrazioni), dagli assoni delle cellule secretrici ipotalamiche, mentre non rispondono allo GnRHa esogeno che è diluito nella circolazione sistemica

- allo scopo di stimolare i primi stadi della gonadogenesi, le preparazioni gonadotropiche possono essere più appropriate dello GnRHa. Per tali motivi, la ricerca è volta all'induzione della gametogenesi o anche all'anticipazione della pubertà, mediante la somministrazione di gonadotropine ed in particolare di hCG, sia come iniezioni che come sistemi a rilascio prolungato gli studi in merito sono però ancora scarsi