



18 Novembre 2011
Discorso del
Prof. George Seidel

La Ricerca
Biotecnologica
in campo zootecnico
e biomedico

CONFERENZA di presentazione del
Comitato Scientifico della FONDAZIONE AVANTEA

Prof. George Seidel

Professore illustre del Dipartimento di Scienze Biomediche della Colorado State University.

“Le biotecnologie della riproduzione per l'allevamento animale e il miglioramento genetico”

(Reproductive biotechnologies for animal breeding and selection)

“Bene, vorrei iniziare ringraziando il professor Galli e la dottoressa Lazzari per avermi invitato a parlare in questa sede e per la generosa ospitalità che hanno dimostrato nei miei confronti. Questa è una traccia della presentazione. Innanzitutto vorrei darvi alcune informazioni generali sulla scienza, su quello che fanno gli scienziati, e poi sugli animali che utilizziamo. La mia discussione si concentrerà sugli strumenti delle tecniche riproduttive. Parleremo delle applicazioni attuali e di alcune applicazioni futuristiche e poi vorrei concludere con alcune questioni etiche.

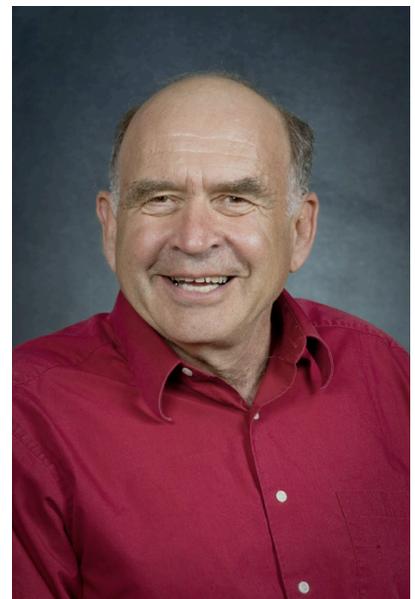
Bene. Cosa fanno gli scienziati? Creano nuova conoscenza, e lo fanno in parte pensando, quindi utilizzando il loro cervello, e in parte attraverso gli esperimenti. Alcuni sono anche scienziati applicati, quindi applicano le informazioni ottenute attraverso gli esperimenti e poi insegnano e pubblicano le informazioni.

Vorrei dividere gli animali che utilizziamo in due gruppi. Gli animali bersaglio, ovvero gli animali da laboratorio, come per esempio i conigli e i topi, che vengono utilizzati per avere maggiori informazioni di base. Poi abbiamo gli animali da allevamento, come i bovini e i suini, gli animali da compagnia, come i cani, i gatti, i cavalli, e poi gli animali che vivono nella natura, animali selvatici, oppure quelli che vivono negli zoo. E infine le persone.

Spesso gli animali sperimentali che utilizziamo sono animali da laboratorio, come per esempio conigli, topi, ratti. Possono essere anche animali da allevamento, mentre talvolta facciamo gli esperimenti sugli stessi animali da laboratorio. Gli animali da allevamento sono unici, perché possono essere sia animali da laboratorio e anche animali bersaglio contemporaneamente. La Fondazione Avantea è specializzata in questo duplice uso delle informazioni.

Vorrei iniziare con una frase latina: *Omne Vivum Ex Ovo*, tutti gli esseri viventi nascono da un uovo. Quindi gran parte del materiale che utilizziamo è rappresentato dall'uovo, chiamato tecnicamente ovocita, e l'embrione allo stato iniziale prima dell'impianto, durante le prime settimane dello sviluppo embrionale, nonché lo sperma. Questi sono i materiali per la tecnologia riproduttiva.

Questo è l'ingrandimento di un ovocita di bovino: è la più grande cellula che si trova nel corpo, di un decimo di millimetro di diametro, ed è circondato da un rivestimento protettivo gelatinoso, che è la zona pellucida. In questa zona pellucida lo sperma cerca di fecondare l'ovocita. Potete notare che lo sperma è molto piccolo rispetto all'ovocita: infatti è la cellula più piccola che si trova nel corpo insieme al nucleo.



Qui abbiamo degli ingrandimenti di embrioni e ovuli bovini viventi. L'embrione si divide a partire da una cellula per formare due cellule, quattro cellule, otto cellule, eccetera. Tutto questo si verifica all'incirca durante la prima settimana dello sviluppo embrionale. Notate che le cellule diventano sempre più piccole man mano che l'embrione si sviluppa e alla fine esce da questa zona pellucida e diventa molto più grande. Questo è un embrione bovino visto con il microscopio elettronico a scansione. Questo è il disco embrionico, che formerà il feto stesso; il resto di queste cellule formerà la placenta. Quindi nell'embrione iniziale ci sono molte cellule che presiedono alle poche cellule che formeranno il feto stesso. Queste sono le cellule che utilizziamo nella tecnologia riproduttiva.

La mia presentazione si concentrerà sugli strumenti della tecnologia riproduttiva. Circa metà dei premi Nobel di fisiologia e medicina riguardano i nuovi strumenti. Nuovi strumenti vengono costantemente scoperti e migliorati. Infatti il professor Galli e la dottoressa Lazzari sono degli esperti nel migliorare questi strumenti. Ogni 7 anni circa appare uno strumento davvero innovativo che rivoluziona le applicazioni scientifiche e il nostro pensiero. Ecco alcuni degli strumenti rivoluzionari che sono emersi negli ultimi 30 anni: il DNA ricombinante, la crioconservazione degli embrioni, la tecnologia transgenica, il trapianto nucleare di cellule somatiche, la reazione a catena polimerasi, la fecondazione con iniezione di sperma, la biologia delle cellule staminali. Il prossimo oratore è stato davvero un pioniere nello sviluppo di circa metà di questi strumenti rivoluzionari.

Ancora una volta molto di quello che facciamo viene fatto a partire dagli embrioni. Dapprima possiamo creare gli embrioni tramite la fecondazione in vitro, possiamo prelevarli dall'apparato riproduttivo femminile, possiamo mettere in coltura gli embrioni in incubatrice per molti giorni, possiamo congelarli e conservarli a -196 gradi Celsius in azoto liquido per decenni. Possiamo determinare il sesso degli embrioni e possiamo determinare anche il patrimonio genetico dell'embrione. Possiamo separare le cellule degli embrioni per ottenere gemelli identici, trigemini, quadrigemini, sotto forma di clonazione. Possiamo mescolare due embrioni per creare una chimera; possiamo aggiungere, togliere o correggere i geni degli embrioni. E, ancor più importante, possiamo prendere questi embrioni e rimetterli nell'apparato riproduttivo per generare prole, dopo questa manipolazione.

Gli strumenti che utilizziamo per aggiungere embrioni o comunque lavorare con gli embrioni saranno il prossimo tema che tratterò.

Prima voglio parlarvi della superovulazione, che è già stata menzionata in precedenza. Questo è l'ovaio di una mucca con una ovulazione. Questo è un esempio di un ovaio oggetto di superovulazione con 8 ovulazioni, ma anche l'altro ovaio ha 8 ovulazioni. Solitamente quando pratichiamo la superovulazione, inseriamo un numero di ovuli superiore di 3-10 volte rispetto alla norma. È quindi uno strumento davvero molto importante per la tecnologia riproduttiva.

Abbiamo poi il recupero e il trasferimento degli embrioni. Anni fa questa operazione veniva effettuata chirurgicamente, in anestesia generale: si effettuava un'incisione nella mucca, si recuperavano gli embrioni e si trasferivano. Ora però questo metodo è cambiato grazie al miglioramento della tecnica, quindi ora questa stessa operazione viene effettuata senza che sia necessario intervenire chirurgicamente, sia nelle mucche, giumente, donne, capre, e talvolta anche nelle scrofe.

Questa immagine mostra uno dei miei studenti nell'atto di recuperare gli embrioni in modo non chirurgico da una mucca. È una sorta di inseminazione artificiale inversa, dove si fa fluire del liquido nella camera riproduttiva. Gli embrioni vengono raccolti all'interno di un filtro, che vedete qui. Uno dei vantaggi degli animali da allevamento è che possiamo condurre questi esperimenti senza bisogno di intervenire chirurgicamente, perché nel caso degli animali da laboratorio bisogna necessariamente effettuarlo chirurgicamente, perlomeno nel caso dei piccoli animali da laboratorio. Qui vediamo la stessa tecnica applicata a un cavallo. Possiamo anche sostituire gli embrioni in modo non chirurgico, una procedura simile all'inseminazione artificiale. Inoltre, se combiniamo la superovulazione e il trasferimento degli embrioni possiamo potenziare la capacità riproduttiva delle mucche. Normalmente una mucca ha un vitello all'anno. Questa mucca ha avuto 10 vitelli. Ma queste riceventi hanno portato avanti la gestazione dei vitelli prodotti dalla madre genetica. La cosa

interessante è che quando abbiamo scattato questa foto la madre genetica non capiva cosa stesse accadendo. Invece gli animali riceventi erano molto preoccupati perché venivano privati della loro prole. È bene sottolineare che è importante chi si prende cura dei piccoli, non tanto le madri genetiche, e le mucche lo sanno bene.

Possiamo anche utilizzare il recupero e il trasferimento degli embrioni per fare un salvataggio genetico, per esempio nel caso degli animali affetti da virus. La zona pellucida intorno all'embrione lo protegge dai virus. Noi possiamo sterilizzare ogni embrione e dunque prelevare gli embrioni da un animale infetto e trasferirli in un animale non infetto, salvaguardando dunque la genetica.

Queste tecniche possono essere usate anche per risolvere i problemi di infertilità, e quindi talvolta le usiamo per le mucche o le giumente sterili, e naturalmente anche in caso di infertilità negli esseri umani. Queste tecniche sono molto interessanti come supporto per la riproduzione nel caso delle specie minacciate.

Un altro strumento che utilizzo parecchio è il sessaggio dello sperma. Ci sono due tipi di sperma: lo sperma X, che dà origine alla femmina, e lo sperma Y, che dà origine al maschio. Lo sperma X e lo sperma Y sono molto simili, però una differenza consiste nel fatto che lo sperma X ha più DNA. Quindi incubiamo lo sperma con un colorante, che si combina con il DNA, e quando questo colorante viene attivato da una luce laser, diventa fluorescente. Noi misuriamo la fluorescenza e con un'analisi al computer possiamo determinare se si tratta di sperma X o Y.

Questa è l'apparecchiatura utilizzata per sessuare lo sperma: una macchina estremamente complessa, che costa circa mezzo milione di dollari. Vediamo come funziona. Lo sperma marcato viene pompato attraverso una macchina chiamata flussocitometro. Quando lo sperma scorre nell'apparecchiatura viene esposto a una luce laser, crea la fluorescenza, il segnale viene trasmesso a un rilevatore, che lo trasmette al computer per valutare la quantità di fluorescenza. Il computer a questo punto ha tre possibilità: o è probabilmente uno sperma X o è probabilmente uno sperma Y o è impossibile determinare di che tipo di sperma si tratta. Nell'apparecchiatura si formano delle goccioline. Se la gocciolina contiene sperma con cromosoma X, sulla gocciolina si forma una carica elettrica positiva. Se la gocciolina contiene sperma con cromosoma Y, sulla gocciolina si forma una carica elettrica negativa. Queste goccioline scorrono attraverso campi elettrici. Questo è un campo elettrico negativo, questo invece è un campo elettrico positivo. Nell'elettricità gli opposti si attraggono, quindi le goccioline con carica positiva vanno verso il campo negativo, mentre le goccioline con carica negativa vanno verso il campo positivo, mentre le goccioline senza carica cadono direttamente e così otteniamo tre flussi di goccioline X, Y, o impossibili da determinare.

Questa apparecchiatura è molto sofisticata: circa 80.000 le goccioline formate ogni secondo. Circa 1/3 delle goccioline contiene lo sperma, quindi valutiamo circa 25.000 spermatozoi, in serie, ogni secondo. Il rilevatore fa 180.000 misurazioni al secondo per stabilire se lo sperma è X o Y. Lo sperma fluisce a una velocità di 80 km/ora e naturalmente il costo è decisamente elevato. Però si tratta di una macchina davvero fantastica.

L'accuratezza del sessaggio può superare il 95%. Lo standard del settore è il 90%, ma più è puro, più è costoso quando si tratta di fare una selezione dello sperma. L'accuratezza è analoga sia per la produzione di sperma X sia per quella di sperma Y.

Il sesso è sicuramente il tratto genetico più importante: più importante, per esempio, di tratti quali la crescita e la riproduzione. Qui ci sono appunto vitelle femmine prodotte. È ovvio che i tori non fanno il latte, quindi gli allevatori preferiscono sicuramente avere delle femmine tra i loro vitelli migliori. Questo è un esempio di vitelle che abbiamo prodotto con il seme X. Sono femmine, abbiamo inoculato il seme X e quindi hanno partorito delle femmine: due generazioni senza maschi. Brevemente vorrei menzionare lo strumento della crioconservazione. Naturalmente può essere utilizzato per lo sperma, gli ovociti e gli embrioni.

Quindi la domanda è: per quanto tempo è possibile conservare lo sperma o gli embrioni per poi scongelarli e riutilizzarli? I dati che abbiamo raccolto finora ci dimostrano che dopo 40 anni la fertilità dello sperma è pari a quella dopo un'ora. Da vari esperimenti e calcoli teorici è decisamente chiaro che queste cellule possono essere conservate per 400 anni senza un deterioramento

individuabile e alcuni pensano che si possa arrivare a più di 5.000 anni. Quindi questo materiale congelato è molto al sicuro, sempre che sia mantenuto congelato così.

Vediamo ora la fecondazione in vitro, che è stata la base del premio Nobel dello scorso anno al professor Robert Edwards, che si è occupato per l'appunto della FIV negli esseri umani. C'è quella convenzionale, dove si mettono assieme ovulo e sperma sul vetrino, o nella provetta, e poi c'è un caso particolare di iniezione dello sperma per la fecondazione in vitro. Io lo chiamo fecondazione con la forza bruta, perché si va a iniettare direttamente lo sperma nell'ovulo.

Applicazioni dell'iniezione dello sperma per la fecondazione in vitro.

Innanzitutto maschi subfertili, con uno sperma non abbastanza forte da fecondare, quindi deve essere iniettato nell'ovulo. Questo sistema è usato molto in umana. Sperma danneggiato a causa di un problema nel contenitore di azoto liquido: quindi lo sperma non nuota più, non è più vivo, ma il DNA sì. Questo sistema è stato poi usato con lo sperma liofilizzato, tenuto a temperatura ambiente per diverse settimane e poi iniettato in modo tale da poter avere della prole. Lo sperma è morto, secondo la definizione della vita, ma il DNA no: lo si può iniettare. Si conserva in un normale freezer di casa, a -20°C , per un anno. E può essere utilizzato per produrre la prole, appunto, con l'iniezione dello sperma.

Vediamo ora qualche altro metodo, per esempio la micromanipolazione e la microchirurgia. Noi usiamo lo strumento del micromanipolatore. Questo strumento prende il movimento della mano e lo trasforma nel movimento più accurato del microscopio. Usiamo un joystick. È come fare i videogame, in un certo senso. Questa immagine illustra una micromanipolazione che abbiamo fatto nel mio laboratorio. Qui vedete un embrione che viene tenuto per aspirazione con questa pipetta di tenuta. Vedete questa microlama che entra, perfora la zona pellucida e divide la cellula in due metà. Quindi abbiamo prodotto due emibrioni da un unico embrione intero. Abbiamo trasferito questi embrioni e abbiamo sviluppato queste due gemelle identiche. Con questa procedura nel mio laboratorio abbiamo prodotto centinaia di gemelli identici, di mucche, cavalli e pecore. È possibile dividere l'embrione anche per fare 3 gemelli identici, sebbene sia un po' meno pratico.

Un altro strumento per la tecnologia della riproduzione è la transgenesi. Con questa tecnica possiamo aggiungere geni all'embrione, li possiamo rimuovere, quindi cancellare, oppure li possiamo correggere. Questa illustrazione mostra un cromosoma: se cancelliamo i geni, il prodotto è un cromosoma più corto; se aggiungiamo geni, il prodotto risultante è un cromosoma più grande. Se questi cambiamenti avvengono nella fase monocellulare (come viene illustrato in questa immagine, con un embrione monocellulare di topo), quando c'è la divisione cellulare, ogni cellula del corpo ha questo cambiamento transgenico.

Applicazioni transgeniche

Innanzitutto una crescita degli animali più efficiente. Per esempio abbiamo introdotto animali senza corna. Resistenza alla malattia, per esempio abbiamo aggiunto geni alle mucche da latte in modo da limitare la mastite, e poi la produzione di sostanze farmaceutiche nel latte, o nel sangue, finalizzate all'uso umano, che possono essere prodotte a costo minore rispetto all'estrazione delle stesse dal sangue umano e quindi sono anche più sicure rispetto a quando vengono ottenute dagli umani stessi. Ecco alcuni esempi dell'uso della tecnologia transgenica. Qui vedete un vitello che abbiamo prodotto con più fibre muscolari aggiungendo un gene per la crescita muscolare.

Per concludere vorrei parlare di alcune idee futuristiche. Un esempio è quello di fare tori transgenici che producono solo sperma X o Y, in modo tale da non dover utilizzare l'identificatore di sperma. Questo è già stato dimostrato come possibile nei topi: siamo riusciti a creare una razza di topi che produce non al 100% sperma X o Y, ma al 70% sperma Y. E poi – questo è uno dei miei preferiti – potremmo inserire nelle mucche il gene che manda in letargo gli orsi, in modo tale che vadano in letargo durante l'inverno. Questo è utile per esempio per le vacche da carne. Vedete, queste sono le mie mucche in estate durante il trasferimento sui monti. In estate devono allattare i vitelli, ma dopo lo svezzamento in inverno hanno bisogno di mangiare tanto fieno. Invece se le facessimo andare in

letargo (anche solo parzialmente) potremmo alimentarle di meno. Questa è una delle tante idee possibili, insomma.

Questa è un'altra possibilità: immettere nel cromosoma Y i geni della crescita. In questo caso gli animali avrebbero femmine più piccole; la crescita extra viene espressa solo dopo la nascita e solo nei maschi. Quindi usiamo questo seme sessato per avere maschi più grandi; le femmine rimangono più piccole, quindi non mangiano così tanto e rimangono più efficienti. Questo è un esempio delle possibili applicazioni futuristiche.

E ora un'altra possibilità che mi piace moltissimo: la prole con due padri genetici. Questo è un ovocita di coniglio fecondato da due spermatozoi. Questo è il pronucleo, materiale genetico da uno spermatozoo e questo è il materiale genetico dell'altro spermatozoo, mentre questo è il materiale genetico della femmina. Questo triplo embrione normalmente morirebbe nello sviluppo embrionale e questo si verifica naturalmente in circa l'1% degli embrioni e con la fecondazione in vitro anche più frequentemente. Però noi possiamo correggere questo problema rimuovendo uno dei pronuclei maschili. In tal caso poi si ha un embrione normale. Però è possibile rimuovere anche il pronucleo femminile. In tal caso l'ovulo ha due padri, ma nessuna madre. Se entrambi vengono da uno spermatozoo X, avremo una femmina, quindi femmina con due padri e nessuna madre.

Ora, ci sono delle limitazioni biologiche a questo, naturalmente. Però vorrei parlarvi di una possibile applicazione. Per esempio ricreare il mammut della tundra. Sono state trovate delle carcasse congelate in Siberia. Il DNA della maggior parte delle cellule è danneggiato, ma il DNA dello spermatozoo ha un aspetto diverso e quindi viene conservato meglio. Quindi potremmo usare un ovocita di elefante e iniettare due spermatozoi. Lo spermatozoo è morto, però magari il materiale genetico è integro, quindi se iniettiamo due spermatozoi X avremo un mammut femmina, se iniettiamo uno spermatozoo X e uno spermatozoo Y avremo un maschio, quindi trasferiamo l'embrione nell'elefante, ecc. ecc.

Ci sono alcune questioni biologiche, per esempio l'imprinting, che rappresentano una barriera a questa tecnologia. Tuttavia ci sono dei modi per bypassare il problema dell'imprinting, come è già stato fatto nel caso degli animali con due madri senza padre. Poi ci sono questioni etiche. Per esempio, dobbiamo ricreare il mammut della tundra? Beh, d'altro canto possiamo affermare che gli esseri umani sono responsabili dello sterminio del mammut e quindi forse potremmo avere la responsabilità di farlo tornare in vita.

Questo ci porta ad altri aspetti dell'etica scientifica. Nella scienza il nostro lavoro si fonda molto sui principi etici. Alcune azioni da parte degli scienziati che vengono considerate negativissime sono la fabbricazione dei dati, la falsificazione dei dati, il plagio, cioè usare il lavoro degli altri facendo finta che sia il proprio, quindi gli scienziati che fanno queste cose sono considerati dei pessimi cittadini scientifici e quindi non riescono più a ottenere fondi per le loro ricerche, se azioni di questo tipo vengono scoperte. Ma fortunatamente la scienza si autocorregge, quindi ci sono magari altre persone che cercano di fare lo stesso esperimento e scoprono che non funziona, quindi questo è un altro aspetto dell'etica della scienza.

Voglio ora aggiungere una riflessione sugli animali da laboratorio. Anche qui ci sono aspetti etici. Intanto dovremmo trattarli in modo umano, dando loro un buon ambiente, delle buone strutture in cui vivere. Dobbiamo preservare la loro nutrizione e salute, minimizzare il dolore e lo stress, avere del personale specializzato, usare anestetici e analgesici e poi avere un buon progetto sperimentale.

E poi gli esperimenti stessi. Innanzitutto gli esperimenti sono importanti, sono interessanti? C'è un buon motivo per farli? Si fa un uso appropriato delle risorse? Gli esperimenti sono pericolosi o non etici? E poi una cosa molto importante: il fatto di non fare nulla rappresenta di per sé un'azione. E ancora, queste tecniche dovrebbero essere usate per le applicazioni umane? Beh, in molti casi sì, in molti casi invece no.

E con questo vorrei ringraziare la Fondazione Avantea per avermi invitato, i molti mentori che ho avuto nella mia carriera, i colleghi scientifici, i miei studenti che mi hanno aiutato negli esperimenti. Spesso invece dimentichiamo di riconoscere l'importante contributo dei tecnici e del personale della segreteria, che tanto ci aiutano nei nostri sforzi. Grazie.”

Prof. George Seidel

Docente del Dipartimento di Scienze Biomediche e Responsabile del Laboratorio di Biotecnologia e Riproduzione Animale, presso la Colorado State University. Seidel, pioniere della tecnologia del seme sessato nei bovini ed equini, insegna Fisiologia Riproduttiva, Endocrinologia e Tecniche di Ricerca per Gameti e Embrioni. Le sue aree di ricerca riguardano la fecondazione in vitro e coltura di embrioni mammiferi, incluse i relativi campi della maturazione di ovociti, micromanipolazione e crioconservazione di embrioni e ovociti.