

Società Italiana di Embryo Transfer

Notiziario Maggio 2001

Cari Soci,

come Presidente entrante desidero innanzitutto esprimere il mio rammarico per la rinuncia da parte della dott.ssa Giovanna Lazzari alla Presidenza della nostra Società.

In questi ultimi tre anni Giovanna ha dato alla SIET un enorme contributo di carattere scientifico e di impegno personale nel presiedere i nostri congressi e nel rappresentarci agli incontri scientifici internazionali. La sua capacità organizzativa, l'impegno profuso nel divulgare periodicamente il notiziario SIET, oltre all'alto livello scientifico, hanno fatto di Giovanna un Presidente difficilmente sostituibile.

Risulterà così ancora più difficile per me affrontare l'incarico affidatomi dall'attuale Consiglio.

E' comunque con profondo orgoglio e grande entusiasmo che affronto questo triennio di Presidenza.

Come socio fondatore credo che questa nostra Società possa dare ancora tanto professionalmente e possa riuscire a mantenere quei contatti che spesso la nostra attività ci porta a trascurare.

Scusandomi per la tardiva presentazione mia e del nuovo Consiglio mi è gradita l'occasione per porgere a tutti i Soci gli auguri di un buon lavoro.

Consiglio Direttivo SIET

Presidente: Roberto Landriscina

Vicepresidente: Enrico Morvillo

Segretario: Raffaele Boni

Tesoriere: Giancarlo Albertari

Consiglieri:

Carmine Danza Sproviero

Gaetano Mari

Roberto Tezzele

Vi ricordo che entro la fine di maggio tutti noi siamo invitati a far pervenire al Dr. Francesco Brun, presso l'Associazione di razza Frisona, i dati relativi alla nostra attività. Questo è indispensabile per la compilazione di statistiche che la AETE e la IETS utilizzano per monitorare l'attività dell' Embryo Transfer in Europa e nel mondo.

Ricordo inoltre ai Soci non ancora in regola con la quota associativa che possono effettuare il pagamento tramite bonifico bancario presso la Cassa Rurale di Folgaria BCC-38064 Folgaria (TN)

COD. ABI 08091 - CAB. 34820 -

C.C. NR. 17397.

Cordialmente

Roberto Landriscina (Presidente)

Notiziario S.I.E.T. - Maggio 2001

sede sociale : c/o Faver, Via Belgio 10, 37135 Verona

tel. 045 8201830 - fax 045 581558

sede operativa :c/o Roberto Landriscina, Via Po 2, Casanova del Morbasco
26100 Cremona

tel. 0372 21388 - fax 0372 568887

e-mail rolandri@tin.it

Effetti dello stress sull'efficienza riproduttiva della bovina

Raffaele Boni

Dipartimento di Scienze della Produzione Animale, Potenza

L'opera di miglioramento genetico degli animali di interesse zootecnico, pur producendo un aumento delle produzioni animali tali da raggiungere situazioni talora estreme e tali da compromettere il benessere degli animali allevati (vedi tecnopatie quali collasso puerperale, chetosi, etc), non è tuttavia riuscita a condizionare i parametri riproduttivi, che vengono invece espressi al meglio solo quando l'animale ha la "consapevolezza biologica" di assicurare un adeguato futuro alla sua discendenza. La domesticazione ha stabilito un rapporto uomo-animale basato su regole di fiducia tali da consentire, a differenza dello stato di cattività, un adeguato svolgimento dell'attività riproduttiva. Questa può venire sospesa nei periodi ritenuti sfavorevoli in funzione di informazioni genetiche (come nel caso della stagionalità) o ambientali. L'efficienza riproduttiva degli animali allevati può quindi rappresentare uno dei più validi indicatori del loro stato di benessere.

Una definizione zootecnica dello stato di benessere potrebbe coincidere con la capacità che ha un animale di esprimere al meglio il proprio potenziale genetico. Variazioni ambientali repentine o durature possono compromettere tale capacità e creare nuove condizioni di adattamento. Il passaggio dell'organismo da una condizione di equilibrio con l'ambiente che lo circonda ad una nuova interferisce con lo stato di benessere e innesca uno stato di emergenza che coinvolge il sistema neuroendocrino. Tale condizione viene generalmente indicata come stress.

Vari possono essere gli stimoli capaci di evocare uno stato di stress negli animali domestici. Conseguenza implicita di tale condizione è la riduzione dell'efficienza riproduttiva. E' noto, ad esempio, che il tasso di fertilità degli animali allevati decresce al crescere della produzione.

Le principali cause di stress verificabili nel postpartum della bovina possono derivare da condizioni ambientali (stress termico, squilibri alimentari), manageriali (stress da trasporto, cambiamenti di gruppo) e patologiche (distocie, collasso puerperale, affezioni podali, mastiti).

L'asse neuroendocrino rappresenta senz'altro il sistema regolatore dell'attività riproduttiva e la pulsatilità dell'LH uno dei suoi principali strumenti di azione. Alterazioni nella pulsatilità dell'LH sono state evidenziate in animali sottoposti a trasporto così come in animali trattati con elevati dosaggi di insulina o con somministrazioni prolungate di ACTH comportando disfunzioni ovariche, bassi livelli ematici di estradiolo e alterazioni del picco di LH, indispensabile per una corretta maturazione e ovulazione del follicolo preovulatorio. Prove sperimentali hanno dimostrato una significativa riduzione del numero di ovulazioni in bovine sottoposte a trasporto ripetuto ogni 12 ore per un periodo di 15-60 minuti durante il trattamento di superovulazione. Una ridotta efficienza alla FA (81% vs 96%) è stata, inoltre, osservata in manze sottoposte a marce forzate di circa 5 miglia nei 2 giorni successivi alla inseminazione effettuata su calore indotto.

Il cambiamento di gruppo è un'altra causa di stress poco considerata negli animali allevati. Le nuove interazioni sociali assumono, inoltre, un particolare valore nel postpartum, momento in cui l'animale è sottoposto all'effetto di altre fonti di stress quali parto, cambio di alimentazione, lattazione. Conseguenza di ciò è l'aumento del numero delle inseminazioni per gravidanza. Tali considerazioni vanno valutate nell'organizzazione di un programma di superovulazione in quanto cambiamenti di posizione degli animali potrebbero compromettere l'efficienza del trattamento.

Numerose sono le condizioni patologiche capaci di compromettere l'efficienza riproduttiva degli animali allevati in forma secondaria, in quanto causa di stress cronico. Infezioni podali causano una riduzione pari al 16% dell'efficienza di FA al primo intervento con un aumento medio di 0.5 dosi di seme per gravidanza. Il collasso puerperale causa un aumento medio di circa 10 giorni di intervallo parto-concepimento e un aumento di 0.5 dosi di seme per gravidanza. I parti distocici sono responsabili di ritardi nella involuzione uterina postpartum, un ritardo medio di 8 gg nella ripresa ovarica, un aumento dell'incidenza di cicli anormali e un allungamento medio di circa 20 giorni dell'intervallo interparto. Nel caso, inoltre, che la distocia sia severa e venga risolta con taglio

cesario, problemi derivano dalla maggiore incidenza di riforma obbligata, dalla ridotta efficienza dell'FA al primo servizio (33% vs 71%), dall'aumento del numero di dosi di seme richieste per gravidanza (3,2 vs 1,6) e dall'aumento dell'intervallo parto-concepimento (137 vs 97 giorni).

La maggior parte delle informazioni disponibili sugli effetti dello stress sull'efficienza riproduttiva della bovina derivano, tuttavia, dagli studi sullo stress termico. Esso interessa simultaneamente le 3 componenti coinvolte nell'attività procreativa: il maschio, la femmina ed il prodotto del concepimento.

La ridotta fertilità del maschio esposto ad elevate temperature ambientali deriva da alterazioni dei meccanismi di spermatogenesi. Procedure di norma impiegate per contrastare tali effetti sono rappresentate dall'impiego della FA con seme congelato nella routine aziendale così come nel caso dei centri genetici dalla sospensione dei prelievi di materiale seminale in corrispondenza dei periodi sfavorevoli o applicando misure di climatizzazione agli ambienti.

Di più difficile soluzione sono gli effetti sulla femmina e sul prodotto del concepimento. Nella femmina tale condizione comporta riduzione delle manifestazioni estrali, alterazioni dello sviluppo follicolare, della competenza meiotica degli oociti nonché dello sviluppo embrionale.

L'alterazione a carico delle manifestazioni estrali coinvolge sia la durata, valutata in manze Guernsey dalla riduzione a 12.5 vs 17 ore a seguito del cambiamento di temperatura da 18°C a 33.5°C, che la percentuale di calori non rilevati, che raggiunge in Florida livelli del 75% vs 50% rilevati nei restanti periodi dell'anno. Tale condizione è attribuibile non solo alla riduzione dei livelli estrogenici ma anche all'aumento dei livelli ematici di cortisolo, responsabile della riduzione degli effetti comportamentali indotti dagli estrogeni, e, verosimilmente, dalla riduzione dell'attività di relazione conseguente allo stress termico. Tali effetti possono essere contrastati dall'impiego di sistemi di rilevamento dell'estro o ricorrendo a trattamenti di sincronizzazione dell'ovulazione.

Tra gli effetti che lo stress termico produce a carico della dinamica follicolare degna di rilievo è la riduzione della dominanza follicolare. E' stato, infatti, dimostrato che uno stress acuto in corrispondenza del giorno 1 del ciclo estrale produce un aumento dei follicoli di diametro superiore ai 10 mm e anticipa l'emergenza della seconda ondata follicolare.

La scadente qualità degli embrioni raccolti in corso di stress termico è associata ad una scadente qualità degli oociti valutata sia mediante prelievi post-mortem, da ovaia di soggetti macellati, che infra-vitam, mediante ovum pick-up. Questo riscontro potrebbe essere attribuibile a disturbi a carico sia della crescita follicolare che dei meccanismi ovulatori. In particolare, tra le cause responsabili del danno gametico un ruolo di rilievo assume senz'altro la ridotta attività trascrizionale degli oociti durante talune fasi di accrescimento. La scarsa capacità di reagire a stimoli termici con produzione della HSP70 (proteina dello shock termico) potrebbe rappresentare uno dei meccanismi biochimici in grado di condizionare l'attività riproduttiva non solo in corrispondenza dello stress termico ma con ripercussioni anche in periodi successivi.

Tra i fattori capaci di condizionare la sensibilità individuale allo stress termico sono compresi componenti sia di natura genetica che ambientale. E' accertato, per esempio, che nei mesi estivi la qualità degli oociti di *Bos indicus* è migliore rispetto a quella di *Bos taurus*.

La produzione di latte rappresenta un altro fattore capace di condizionare la sensibilità allo stress termico. Casistiche americane riportano infatti che, a parità di condizioni ambientali, è evidenziabile una significativa variazione di fertilità nel corso dell'anno negli animali in lattazione non rilevabile negli animali non in produzione. Inoltre, se l'efficienza alla superovulazione durante i mesi estivi è minima nelle vacche da latte, essa non risente di tali oscillazioni negli animali da carne.

La ridotta efficienza di produzione embrionale conseguente a tale stress è riconducibile ad una riduzione della risposta superovulatoria, dell'efficienza di fecondazione degli oociti e della qualità embrionale. Una riduzione dell'efficienza di produzione embrionale è, tra l'altro, denunciata anche da taluni laboratori di produzione embrionale in vitro. L'assenza di tale fenomeno in laboratori che operano in analoghe condizioni potrebbe verosimilmente essere attribuito alle caratteristiche delle donatrici rappresentate nei laboratori insensibili allo stress termico principalmente da soggetti da carne o da razze e genotipi tolleranti a tali condizioni climatiche.

Gli effetti dello shock termico sulle prime fasi di sviluppo embrionale sono da considerarsi di tipo multifattoriale. Elevate temperature del tratto genitale femminile compromettono ad esempio la

sopravvivenza e l'attività fecondante degli spermatozoi. Esperimenti di trasferimento embrionale incrociato tra soggetti sottoposti a diverse condizioni climatiche hanno consentito di isolare gli effetti dell'ipertermia sullo sviluppo embrionale da quelli legati all'ambiente uterino. Manze riceventi non sottoposte a stress termico hanno prodotto un'efficienza all'ET pari al 24% o del 57% a seconda se gli embrioni trasferiti derivassero da donatrici sottoposte o meno a stress termico. Lo stress termico sulla ricevente svolgerebbe un effetto invece di minore entità producendo una riduzione dell'efficienza di ET pari a circa il 7%. Da questi studi emerge che sensibilità dell'embrione allo shock termico è massima nei primissimi momenti di sviluppo embrionale e decresce già a partire dal 3 giorno. Ciò suggerisce che la tecnica ET potrebbe rappresentare una valida alternativa alla FA durante il periodo di stress termico. Prove comparative di ET e FA sono state quindi intraprese in Florida durante il periodo estivo. Da queste emerse che in tali periodi l'efficienza di ET è sensibilmente superiore a quella di FA (29.2% vs 13.5%). I risultati appaiono tuttavia in entrambi i casi difficilmente proponibili nelle condizioni di campo e poco giustificabili dall'alto costo dell'embrione. Successivamente la prova venne ripetuta con embrioni prodotti con tecniche in vitro e trasferiti in riceventi con ovulazione sincronizzata. L'efficienza del sistema proposto risultava interessante (25%) qualora gli embrioni fossero trasferiti freschi; essa si abbassava, tuttavia, drasticamente col trasferimento di embrioni in vitro congelati (12%) e si manteneva estremamente ridotta nel gruppo di controllo sottoposto a FA (10%).

Gli effetti delle elevate temperature si fanno risentire anche nelle successive fasi di sviluppo embrionale, tanto è che uno stress termico tra l'8° e il 16° giorno di gestazione provoca una riduzione significativa dello sviluppo embrionale. Indagini volte a stabilire l'epoca della mortalità embrionale in corso di stress da calore, effettuate mediante dosaggio della proteina-B specifica della gravidanza (PBPB), suggeriscono che essa è legata ad un alterato sviluppo del trofoblasto conseguente allo shock termico.

Numerose sono state le misure adottate per contrastare gli effetti dello stress termico. Sistemi di refrigerazione quali disposizione di aree ombreggiate, docciature, vasche, ventilatori possono rappresentare validi ausili applicabili a tutto l'allevamento o limitatamente ai gruppi di produzione in cui si intende favorire l'attività riproduttiva. Nelle aree geografiche più coinvolte dal fenomeno è ipotizzabile l'impiego di animali geneticamente resistenti alle elevate temperature. Il carattere resistenza termica, evidenziato da un ridotto aumento della temperatura corporea a condizioni di temperatura elevata, è dotato di buona ereditabilità ($h^2 = 0.25-0.60$) ed è associato a geni specifici legati a caratteristiche del pelo e del mantello capaci di aiutare i soggetti a meglio resistere a tali condizioni. Tali caratteristiche hanno anche fondamenti cellulari tanto è vero che embrioni di razza Brahman (*Bos indicus*) sono risultati più resistenti ad un'esposizione a 41°C di quelli frisoni.

L'impiego di antiossidanti, come carotene e vitamina E, può rappresentare un'altra possibile strategia volta a contrastare gli effetti dello stress termico. Prove in vitro hanno dimostrato un sensibile miglioramento della vitalità di embrioni esposti a shock termico in presenza di tali sostanze. Nelle condizioni in vivo, tuttavia, l'integrazione alimentare con antiossidanti non ha prodotto risultati significativi qualora praticata per periodi limitati. Un sensibile miglioramento della fertilità è stato invece verificato allorché il loro utilizzo è stato praticato per periodi prolungati.

La tecnologia di trasferimento embrionale viene quindi a proporsi come una valida strategia per migliorare l'efficienza riproduttiva degli animali sottoposti a stress termico. I ridotti livelli di efficienza conseguiti, tuttavia, suggeriscono nel periodo estivo l'impiego di embrioni di ridotto valore, quali, ad esempio, quelli di razze da carne prodotti con tecniche in vitro. A differenza di quanto riportato dalle esperienze in Florida, le tecnologie in vitro attualmente disponibili consentono di ovviare ai danni criogenici degli embrioni in vitro consentendo di raggiungere livelli di efficienza poco inferiori rispetto a quelli ottenibili dal trasferimento di embrioni in vivo. Il progressivo rialzo termico a cui il nostro pianeta è sottoposto pone lo stress da calore come uno dei problemi di maggiore interesse nel futuro della zootecnia italiana.

Tagli e Ritagli

Novità sulla Encefalopatia Spongiforme Trasmissibile (TSE)

Il ciclone TSE, partito dall'Inghilterra, ha coinvolto senza scampo l'Europa creando una crisi di tutto il comparto zootecnico, con panico nei consumatori e ripercussioni nel mondo politico. In USA, la malattia, pur se riscontrata da anni, ha invece suscitato un minor clamore sia nell'opinione pubblica che nella classe politica. La comunità scientifica, impreparata su questa nuova forma patogena, ha intrapreso una grossa mole di sperimentazioni che stanno via via chiarendo i numerosi interrogativi proposti.

Sulla patogenesi, ad esempio, è chiara la via alimentare di contagio, con localizzazione del prione dapprima nelle placche di Payer, per poi raggiungere gli organi del sistema reticolo-istiocitario (milza, tonsille, appendice, linfonodi) e, in fase terminale, il sistema nervoso centrale. Sperimentalmente è possibile infettare topi o pecore mediante inoculazione di un lisato cerebrale di animali infetti sia per via endocerebrale che sottocutanea. L'infezione avviene nella totalità dei soggetti trattati con periodi di latenza diversi in funzione della specie e della sede di inoculazione. La proteina prionica PrP^{Sc} ha la stessa composizione aminoacidica di una proteina presente nelle cellule non infette (PrP^C), la cui trascrizione è stata ritenuta un prerequisito per lo sviluppo patogenetico della TSE.

Le attuali metodiche diagnostiche sono condotte post-mortem mediante prove biologiche (inoculazione di estratto cerebrale in topi con riscontro di patologie cerebrali entro un anno) o con prove meno sensibili ma più rapide (western blotting, ELISA). Novità provengono da uno staff scientifico di Edimburgo dove Miele et al. (2001) mediante isolamento dell'RNA trascritto in cellule del sistema reticolo-istiocitario di soggetti infetti, hanno evidenziato la ridotta trascrizione di un fattore eritroide coinvolto nel differenziamento cellulare (EDRF), una proteina presente nelle cellule precursori degli eritrociti. La ridotta della trascrizione del gene che codifica per tale proteina, e quindi la ridotta sintesi di questa proteina, è stata evidenziata nelle cellule di midollo osseo di bovine e nel sangue di pecore infette da TSE. Questo riscontro è di estremo interesse in quanto consentirebbe di individuare soggetti ammalati in fase iniziale. Allo stato attuale non è, infatti, possibile un riscontro precoce della malattia basato sull'accumulo della proteina prionica, PrP^{Sc} a livello delle cellule del midollo osseo e del sistema reticoloistocitario.

Informazioni sulla possibilità di trasmissione per via sessuale della TSE sono attualmente non definitive. Ricerche condotte in Scozia (Foster et al., 1999) hanno indotto l'infezione sperimentale di capre mediante inculazione di lisati cerebrali di bovine infette. Tutte le 10 capre trattate hanno contratto la malattia in forma clinica entro un periodo variabile tra gli 1.5 e i 4 anni dal contagio. Tali soggetti sono stati sottoposti a superovulazione e gli embrioni prodotti trapiantati in riceventi non esposte al contagio. La malattia non è stata riscontrata in nessuna ricevente (n. 22) o capretto (n. 37) nato. Anche i maschi impiegati per la monta naturale sono stati sottoposti ad un prolungato periodo di osservazione senza esitare in nessun caso di TSE. La casistica riportata in tale esperimento, sebbene limitata, consente con un piccolo margine di errore di escludere la via sessuale come possibile via di contagio della TSE. Resta aperto il discorso legato alla trasmissione verticale della malattia.

Referenze

1. Foster J, McKelvey W, Fraser H, Chong A, Ross A, Parnham D, Goldmann W, Hunter N (1999). Experimentally induced bovine spongiform encephalopathy did not transmit via goat embryos. *Journal of General Virology*, 80: 517-524.
2. Foote WC, Clark W, Macilius A, Call JW, Hourrigan J, Evans RC, Marshall MR, de Camp M (1993) Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer. *American Journal of Veterinary Research*, 54: 1863-1868.
3. Dickinson AG, Stamp JT, Renwick CC (1974) Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *Journal of comparative Pathology*, 84: 19-25.
4. Miele G, Manson J, Clinton M (2001) A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nature Medicine*, 7: 361-364.

ATTIVITA' DELL' EMBRYO TRANSFER NEL BOVINO IN EUROPA NEL 1999

(dati raccolti da 20 nazioni)

• <u>Numero totale di embrioni trasferibili</u>	170 451
• Prodotti in vivo	
• Donatrici superovulate	26 429
• Embrioni trasferibili	145 305
• Media per donatrice	5,49
• Prodotti in vitro	25 146
• % di embrioni IVF 14,7	
• <u>Numero totale di embrioni trasferiti</u>	143 168
• Prodotti in vivo 779	129
• Prodotti in vitro	13 389
• Media di embrioni IVF trapiantati	9 ,13%
Percentuale di embrioni congelati e trasferiti	58,0%
Numero totale di embrioni congelati e stoccati	63 403

(Y. HEYMAN, AETE Santander, 2000)

**ATTIVITA' DELL'EMBRYO TRANSFER NELLE
ALTRE SPECI (anno 1999)**

(dati parziali di 9 nazioni Europee)

Specie	Embrioni prodotti	Embrioni trasferiti	Nazioni
Ovino	6.744	6.330	Repubblica Ceca Danimarca Grecia Francia Romania Gran Bretagna
Suino	3.995	534	Repubblica Ceca Romania
Caprino	303	176	Repubblica Ceca Danimarca Romania
Coniglio	3.285	3200	Francia
Equino	222	194	Austria Repubblica Ceca Danimarca Francia Italia Olanda Gran Bretagna

EVOLUZIONE DELL'ATTIVITA' DI EMBRYO TRANSFER NEL BOVINO

Embrioni prodotti	Anno 1997	Anno 1998	Anno 1999
In vivo	145032	141842	145305
In vitro	11443	23458	25146
Totali	156475	165300	170451
% in vitro	7.3%	14.2%	14.7%
Embrioni trasferiti	Anno 1997	Anno 1998	Anno 1999
In vivo	110802	120361	129779
In vitro	7748	14153	13389
Totali	118550	134514	143168
% in vitro	6.5%	10.6%	9.13%
% di embrioni congelati trasferiti	53%	51%	58%

(Y. HEYMAN, AETE Santander, 2000)

Prossimo congresso S I E T, 22 settembre 2001

Ti informo che il prossimo congresso si terrà il 22 settembre di quest'anno presso il Castello di Lagopesole, in provincia di Potenza.

Credo che lo splendore di questo Castello appena ristrutturato e la possibilità di accesso alle sue stupende sale possano essere di stimolo ad una Tua partecipazione. Allevamenti vicini, gestiti dall'APA e con il contributo di alcuni Soci SIET, come Carmine Danza, Vittorio Matta e altri colleghi possono consentire un facile accesso al reperimento di materiale e a dimostrazioni didattiche.

Oltre che per la propria bellezza, la scelta di questa Sede è stato un atto dovuto a tutti quei Soci del sud Italia che per tutti questi anni hanno partecipato con costanza ai precedenti congressi.

L'argomento che è maggiormente richiesto dai Soci SIET riguarda ancora una volta le tecniche di congelamento embrionale.

Il Consiglio ha quindi ritenuto opportuno invitare come relatore principale il Dott. Daniel Bousquet, General Manager e Coordinatore scientifico dell' L'Alliance Boviteq inc., il centro di ET più importante del Quebec, Canada.

Il Dott. Daniel Bousquet, ritenuto uno dei maggiori esponenti dell'embryo-transfer darà ampia visione della realtà dell'embryo-transfer e della fecondazione in vitro in Canada. Nel corso della lezione verranno illustrati i principali criteri per la valutazione nella scelta sia della donatrice che delle riceventi e trattate in modo capillare le tecniche di congelamento embrionale.

Il programma dettagliato del congresso Ti giungerà quanto prima, non appena avremo la conferma di partecipazione degli altri Relatori contattati.

Nel frattempo ti chiedo per problemi organizzativi, di comunicare al più presto la Tua partecipazione ai seguenti indirizzi: rolandri@tin.it - boni@unibas.it o telefonicamente allo 0335 6189584 oppure allo 0338 2998096

P.S. si allegano i siti per visita virtuale di Lagopesole <http://www.powernet.it/apa/lagopesole.htm>
<http://web.tiscalinet.it/prolocolagopesole>