



Società Italiana di Embryo Transfer

Notiziario Maggio 2005

Cari Soci,

il 2004 é stato un anno significativo ed impegnativo per la nostra Società, che ha sviluppato numerose ed interessanti iniziative. In ordine cronologico ricordo la collaborazione intrapresa con la SIVAR nello svolgimento di una giornata sull'ET, relazionata a Cremona dal Dott. Roberto Landriscina e dal Dott. Raffaele Boni nell'ambito del Convegno annuale della Società.

In seguito, la collaborazione tra il dott. Raffaele Boni ed il Prof. Gaetano Mari, ha portato alla realizzazione presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna di un work-shop dedicato alla memoria del Dr. Theo Kruip, scienziato di fama internazionale nel settore dell'embriologia bovina e amico della SIET, da poco mancato. Al workshop dal titolo "Dall'ovocita all'embrione: limiti biologici alla superovulazione nella bovina" sono intervenuti i prof. Fulvio Gandolfi (Università di Milano), Roberto Gualtieri (Università di Napoli), Cesare Galli (Università di Bologna) e Raffaele Boni (Università della Basilicata) riferendo i risultati più recenti delle loro ricerche e spaziando dai meccanismi di maturazione dell'ovocita alle interazioni spermatozoi-ovidutto fino ai fattori capaci di influenzare lo sviluppo in vivo ed in vitro dell'embrione bovino.

Infine, ad Assisi in ottobre, si é svolto il nostro Congresso annuale che ha ospitato come relatori la dott.ssa Paci, che ha relazionato sulla bioetica, il dott. Alunni, che ha riferito le sue esperienze sull'applicazione della tecnica laparoscopica di IS nella pecora nonché ha visto l'intervento di numerosi soci (i dott. Emilio Olzi, Marcello Lora, Pierluigi Guarneri) che hanno portato interessanti contributi derivanti dalla loro vasta esperienza personale. Protagonista dell'evento è stato, tuttavia, il Professore canadese Gregg Adams, contattato grazie all'impegno del Dott. Pierluigi Guarneri. Il Prof. Greg Adams ha illustrato l'utilizzo delle tecniche ecografiche nella ginecologia bovina con un particolare riferimento alle applicazioni relative alla pratica di ET. Il Congresso, ospitato nelle magnifiche sale rinascimentali del

Comune di Assisi, é stato organizzato localmente dal nostro socio Dott. Piero Boni, al quale va tutto il nostro ringraziamento. Al termine del congresso il Prof. Adams si é poi trattenuto presso l'azienda zootecnica del nostro socio PierFrancesco Catarci in Anguillara (RM) per svolgere una giornata di approfondimento teorico-pratico sulle potenzialità applicative dell'ecografo in buiatria.

Come si vede, molti argomenti sono stati proposti all'attenzione dei nostri Iscritti, a testimonianza della grande vitalità ed interesse che le nostre tecniche riproduttive abbracciano.

Potevamo fare meglio e con maggior capacità comunicativa ed organizzativa. Assodata la possibilità e la necessità di approfondire e sviluppare argomenti specifici e collaterali all'embriotransfer, il nostro prossimo impegno sarà quello di migliorare l'organizzazione e la comunicazione nella nostra Società.

Il prossimo Congresso si svolgerà a cavallo tra settembre e ottobre sull'Altipiano di Asiago, in Veneto. I particolari verranno comunicati appena tutti i dettagli saranno messi a punto.

Purtroppo, durante lo svolgimento del Congresso di Assisi, é pervenuta la drammatica notizia della scomparsa del nostro socio fondatore ed amico Achille Gusperti. Il Dott. Gusperti é stato uno dei primi veterinari italiani a praticare l'embriotransfer bovino, sicuramente quello che gli ha dato lo sviluppo iniziale e lo ha fatto diventare una tecnica praticata in tutta Italia con la mitica "E.T. 9". Un amico ed un maestro indimenticabile, capace di insegnare e seguire i suoi allievi nel loro apprendimento e nella loro maturazione, comprensivo ed ironico negli errori, eloquente e con uno sguardo al progresso.

Ci mancherà moltissimo, come uomo, maestro e come amico.

Un saluto ed un augurio di buon lavoro.

Luigi Silvestrelli



Società Italiana di Embryo Transfer

Notiziario Maggio 2005



"HO SOGNATO UN AMICO"

Alcune notti fa ho sognato Achille. E' vero. Francamente mi é capitato poche volte di réincontrare una persona cara in sogno, mai un amico o un maestro.

E' difficile descrivere le sensazioni che ho provato. Questa cosa mi ha colto impreparato e rimango incapace di descriverla con parole adatte.

Ho avuto coscienza del sogno e l'ho vissuto completamente, mi sono abbandonato alla vicenda assaporando la compagnia di un amico e la possibilità di stare con lui in una storia che al mattino é completamente sfumata, lasciandomi in ricordo una sensazione "cremonese" di vacche, cascine, strade e parole.

Le vicende del sogno sono scomparse, ma mi é rimasta una grandissima emozione al risveglio ed un'immensa sensazione di pace e serenità: ero completamente rilassato emotivamente. Mi sono svegliato felice, avevo rivisto Achille e riprovato le stesse sensazioni di quando andavo da lui a Cremona ad imparare e ad aiutarlo. Per me é sempre stato come un leone: all'apparenza distratto, ma vigile ed attento, pronto, con un breve ruggito o una benevola zampata, a rimettere nella giusta via i giovani rompiscatole.

Ruggiti e zampate ne ho presi un'infinità.

Grazie Achille, sono felice di averti réincontrato. So che vivi ancora, anche dentro di me e tornerai a trovarmi.

Ti aspetto.

Gigi Silvestrelli



Società Italiana di Embryo Transfer

Notiziario Maggio 2005

Metodi di valutazione della qualità seminale: limiti e prospettive

Tiziana Zampolla

*Institute of Zoology, Zoological Society of London,
Regent's Park, London, UK*

La qualità del seme riveste un ruolo fondamentale nell'applicazione dell'inseminazione strumentale e nelle procedure di conservazione del germoplasma maschile.

Potremmo dire che un seme di buona qualità è un seme con una buona capacità fecondante. Nelle specie poliovulatorici, come i suini, tuttavia, un buon seme oltre ad assicurare una elevata fertilità deve garantire una altrettanto elevata prolificità. Fertilità e prolificità non sono però i soli fattori in gioco nella valutazione della qualità seminale.

L'obiettivo che si prefigge l'analisi del seme è prevedere in modo accurato e rapido la capacità fecondante di un campione; ciò significa che è importante trovare un'alta correlazione tra i parametri di qualità seminale e fertilità in campo, espressa attraverso il tasso di concepimento o la percentuale di non ritorno.

Numerosi sono i parametri testati allo scopo di ottenere indicazioni predittive della capacità fecondante del seme. Tutte le analisi messe a punto fino ad oggi possono essere distinte in due categorie: quelle appartenenti al metodo classico di valutazione, i cosiddetti sistemi convenzionali, e quelle che rientrano nei nuovi metodi di valutazione.

Il metodo classico si basa su una serie di tests di facile esecuzione e basso costo. Prevede la valutazione del volume dell'eiaculato, della concentrazione spermatica, della motilità progressiva, della percentuale delle cellule vitali, e delle caratteristiche morfologiche degli spermatozoi.

I metodi classici presentano una ridotta efficienza predittiva della capacità fecondante del seme, e sono scarsamente correlati con i risultati di fertilità in campo. Essi permettono, quindi, di individuare soltanto i campioni di qualità scadente ma non permettono di effettuare una distinzione tra seme di qualità eccellente o mediocre. Inoltre, i sistemi convenzionali non garantiscono l'accuratezza della stima.

Per risolvere questi problemi sono state messe a punto nuove metodiche di valutazione che prendono in considerazione anche la funzionalità spermatica.

Prima di passare ai nuovi metodi di valutazione, è opportuno riassumere i sistemi convenzionali e i limiti a questi attribuibili.

Concentrazione spermatica

Un'accurata determinazione del numero di spermatozoi e del volume dell'eiaculato condiziona il numero di femmine che possono essere inseminate.

Per concentrazione si intende il numero di spermatozoi per unità di misura quantitativa (ml-cc) di seme; tale valore è un parametro fondamentale per giudicare la qualità dello sperma. La concentrazione può essere misurata con l'impiego di un emocitometro, colorimetro, o uno spettrofotometro. Con l'emocitometro (camera di Burker) il numero di spermatozoi per camera è stimato da un operatore mediante conta visiva. E' l'unico metodo diretto. Tale metodo è accurato ma richiede molto tempo; i suoi limiti sono rappresentati dal fatto che il campione in esame necessita di una elevata diluizione (che può rappresentare una fonte di errore) nonché dalle difficoltà di conta derivante dai diversi piani focali entro cui possono visualizzarsi gli spermatozoi.

Con l'utilizzo del metodo di conta indiretto, mediante spettrofotometro o colorimetro, i tempi operativi possono essere sensibilmente ridotti. Con lo spettrofotometro, il valore della concentrazione spermatica è ricavato dall'intensità della luce dispersa (diffusa), prodotta dal passaggio attraverso il campione di un fascio di luce, a lunghezza d'onda nota (550 nm), che viene assorbita, riflessa e rifratta dalle cellule in sospensione, e quindi convertita in numero di spermatozoi/ml per mezzo di una curva di taratura precedentemente costruita con l'ausilio di una camera contacellule. Il valore ottenuto dipende, tuttavia, dalla taglia, forma e dall'indice di rifrazione delle cellule in sospensione; tali parametri possono variare per numerose ragioni e ciò presuppone l'adeguamento della curva di taratura. Variazioni di tali parametri possono, inoltre, osservarsi tra individui, ma anche tra eiaculati dello stesso individuo. Tutto ciò rende questo tipo di misurazione poco accurato. Anche l'utilizzo del fotometro produce misurazioni poco accurate nel caso in cui il seme risulti contaminato o per l'aggiunta di diluitori torbidi.

Riuscire ad eseguire una valutazione della concentrazione spermatica con la massima

accuratezza è di fondamentale importanza, poiché in base alla concentrazione iniziale vengono effettuate la diluizione e la successiva preparazione delle dosi di seme; pertanto, una sovrastima o sottostima di questo parametro può compromettere il successo fecondativo o una corretta produzione di dosi inseminanti.

Motilità

La motilità degli spermatozoi rappresenta un elemento importante per la valutazione della qualità spermatica. Essa è dovuta alla contrazione del filamento assiale, legata all'attività dell'actina e miosina per effetto dell'ATP. Gli spermatozoi si muovono con movimenti della coda e, allo stesso tempo, subiscono un movimento di rotazione attorno al proprio asse longitudinale, di modo che, la loro progressione risulti rettilinea.

L'esame dello sperma deve essere eseguito subito dopo la raccolta, ad una temperatura vicina alla temperatura corporea; per evitare shock termici si ricorre all'impiego di un tavolino riscaldante in modo che la temperatura sia tenuta costante per tutto il corso dell'esame. Un primo apprezzamento empirico di tale parametro è fornito dalla motilità di massa: lo sperma è esaminato allo stato non diluito con l'esame visivo diretto o a ridotto ingrandimento. Questo esame permette di apprezzare l'intensità del movimento degli spermatozoi con lo sviluppo di "onde", movimenti di flusso provocati dalla riunione degli spermatozoi seguita dalla loro dispersione. L'esistenza di queste onde è considerata come un indice di buona vitalità dei gameti e di buona concentrazione di spermatozoi. Tuttavia, l'esame di un seme non diluito, di alta densità, non dà che un'idea approssimativa della percentuale degli spermatozoi mobili. Per un esame approfondito è necessario ricorrere all'apprezzamento della mobilità individuale. A tale scopo, un'aliquota di seme viene diluita in un extender idoneo (tale da consentire una buona visibilità all'esame microscopico).

L'analisi della motilità viene condotta secondo i seguenti parametri:

- a) percentuale di spermatozoi motili;
- b) percentuale di spermatozoi progressivamente motili;
- c) velocità spermatica, basata su una scala arbitraria da 0 (stazionario) a 4 (veloce);

La precisione con la quale viene condotta la stima è di importanza notevole; infatti, la percentuale di cellule motili, risulta ben correlata alla fertilità allorché viene presa in considerazione una media di più stime rispetto a singole stime (0,64 vs 0,30; Foote, 1998).

Diverse procedure sono state sviluppate per ottenere una valutazione oggettiva e diminuire l'errore legato alle misurazioni soggettive; tra queste rientra il metodo CASA (Computer-Assisted Semen Analysis), che permette di analizzare numerosi

parametri della motilità ottenendo una migliore correlazione con la fertilità (> 0.90; da Foote, 2003).

Morfologia

Ogni campione di seme contiene alcune cellule spermatiche anormali, la cui incidenza risulta altamente correlata con la fertilità. Fattori ambientali possono condizionare tale evenienza; ad esempio, elevate temperature ambientali combinate con elevati livelli di umidità sono responsabili di una condizione di ipofertilità che può mantenersi per diverse settimane.

Gli eventi che accompagnano il processo di fecondazione richiedono che lo spermatozoo presenti una membrana plasmatica ed un acrosoma intatti; pertanto, l'integrità e la funzionalità della membrana plasmatica e l'integrità dell'acrosoma possono essere considerati fattori condizionanti per una corretta funzionalità spermatica.

Numerosi sono i metodi per la valutazione della membrana plasmatica; tra questi ricordiamo la colorazione vitale eosina-negrosina e l'impiego di vari coloranti a fluorescenza.

Un altro importante parametro utile per valutare la qualità seminale è fornito dalla percentuale di cellule con acrosoma intatto. L'acrosoma è una parte essenziale della cellula spermatica, contenente al suo interno enzimi coinvolti nella penetrazione dello spermatozoo attraverso il cumulo ooforo e la zona pellucida. Per questo motivo, uno stato di degenerazione, malformazione o danni a livello dell'acrosoma compromettono la possibilità da parte dello spermatozoo di fecondare l'oocita. L'integrità dell'acrosoma può essere valutata al microscopio utilizzando diversi sistemi di colorazione.

Le informazioni derivanti da questi tests, tuttavia, mostrano una bassa correlazione con la fertilità in quanto riguardano l'integrità morfologica degli spermatozoi e non la loro funzionalità (processo di capacitazione, reazione acrosomiale ecc.), condizione necessaria per il processo fecondativo.

Novità sulle metodiche di valutazione spermatica

Nuove metodiche di valutazione della qualità seminale sono state intraprese per superare i limiti offerti dai sistemi tradizionali. Alcune di esse, inoltre, permettono di effettuare una più accurata analisi del seme congelato, andando a valutare i danni che il processo di crioconservazione induce a livello di membrana. Importanti informazioni sono scaturite per la valutazione della funzionalità spermatica a seguito dello studio dell'attività biochimica della membrana plasmatica; tale attività è, infatti, richiesta nei processi di capacitazione, reazione acrosomiale e legame dello spermatozoo alla superficie dell'oocita.

Un metodo ampiamente applicato in andrologia, sia nel campo umano che nelle diverse specie di animali domestici, è l'HOST (hyposmotic swelling test);

tale metodo valuta l'integrità di membrana della coda dello spermatozoo. Il suo principio si basa sull'osservazione dell'avvolgimento e del rigonfiamento della coda in presenza di soluzioni iposmotiche. L'abilità della coda dello spermatozoo di gonfiarsi e avvolgersi è indice di una corretta permeabilità della membrana. Tale test non è risultato, tuttavia, di per se capace di fornire risultati indicativi sulla reale fertilità del seme. Sono stati così proposti tests combinati, come la colorazione vitale eosina-negrosina associata all'HOST; tale sistema, denominato STHOST (eosin-negrosin supravital stain combined with hypoosmotic swelling test), consente una elevata predittibilità della fertilità, in quanto valuta sia l'integrità fisica della membrana che la sua attività biochimica (Tartaglione e Ritta, 2004).

Un'altra combinazione di più tests è offerta da un sistema di colorazione doppia, TBG (Trypan-blue Giemsa stain), capace di valutare sia lo stato della membrana plasmatica che della membrana acrosomiale. Il STHOST e il TBG sono due metodi di facile esecuzione che potrebbero essere più largamente impiegati per la valutazione di seme bovino destinato sia alla IS che alla IVF.

La citometria di flusso è un'altra metodica di particolare interesse. In pochi minuti, il citometro di flusso è in grado di acquisire dati sulle diverse sottopopolazioni presenti all'interno di un campione; tale caratteristica rende l'analisi ideale per la valutazione di popolazioni cellulari eterogenee quali quelle spermatiche. Il suo impiego nella valutazione spermatica ha avuto inizio con la determinazione del contenuto di DNA e la sua applicazione all'analisi spermatica è aumentata nell'ultimo decennio. Oggi tale tecnica è applicata alla valutazione di caratteristiche come la concentrazione, la vitalità cellulare, l'integrità di membrana, la funzione mitocondriale, lo stato di capacitazione, la fluidità di membrana e lo stato del DNA. L'impiego della citometria consente di valutare un ampio numero di spermatozoi in un breve intervallo di tempo rispetto alle tecniche "tradizionali", permette di lavorare con piccoli campioni, ha un alto livello di ripetibilità, elimina la soggettività dell'analisi, permette la valutazioni di più parametri contemporaneamente. Scarsa risulta, tuttavia, essere l'applicazione di questa metodica come test di previsione della fertilità; risultati non brillanti sono infatti emersi quando tale metodica è utilizzata per la valutazione di parametri di stima della fertilità, con l'eccezione del SCSA (sperm chromatin structure assay). Questa applicazione si basa sulla valutazione dell'integrità strutturale della cromatina, colorata con arancio di acridina, che presenta un'elevata correlazione con la fertilità in numerose specie animali (toro, ratto, uomo, Evenson 1980). Essa consentirebbe l'eliminazione di maschi con bassa fertilità, fornendo

una buona predittibilità delle caratteristiche di fertilità del materiale seminale. L'utilizzo della citometria di flusso per l'analisi routinaria del seme avrebbe numerosi vantaggi; esso è, tuttavia, limitato al solo ambito scientifico per il costo e le difficoltà di impiego associate alla richiesta di personale specializzato. Altre problematiche, legate al fatto che si tratta di uno strumento sofisticato e di grandi dimensioni, potrebbero, invece, essere superate nel tempo grazie al progresso tecnologico.

Conclusioni

In molti centri genetici la valutazione del seme viene ancora eseguita con la sola analisi della concentrazione e della motilità; tuttavia, è chiaro che per ottenere indicazioni predittive della fertilità del seme è necessario ricorrere a più tests. Per questo motivo, in aggiunta ai metodi tradizionali, sarebbe opportuno introdurre analisi complementari come quella microscopica, citometrica di flusso e tests funzionali, come la capacità di attraversare il muco cervicale, l'interazione con le cellule del tratto riproduttivo e l'analisi della motilità spermatica mediante sistemi computerizzati di valutazione.

Ciò consentirebbe la conservazione e l'utilizzo di germoplasma dotato di elevata capacità fecondante utile per ottimizzare le tecniche di inseminazione strumentale e di produzione embrionale, alla base dello sviluppo di razionali programmi di miglioramento e salvaguardia di patrimoni genetici.

Bibliografia

- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210:1131-3.
- Foote RH. Selected unpublished information on artificial insemination from Bob Foote's notebooks. In: Proceedings of the 17th Technical Conference on Artificial Insemination Reproduction: 1990-1999. NAAB, Columbia, MO.
- Foote RH. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci* 2003; 75: 119-139.
- Gadea J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 2005; 63:431-444.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 2005; 63:445-457.
- Phillips NJ, McGowan MR, Jhonston SD, Mayer DG. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Anim Reprod Sci* 2004; 81: 47-61.
- Tartaglione CM, Ritta MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2004; 62: 1245-1252.
- Woelders H. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Reproduction in Domestic Animals. Boar Semen Preservation II*. 1991; 145-164.

Comunicazioni ai soci

Invio statistiche ET. Vi ricordo che entro la fine di maggio tutti noi siamo invitati a far pervenire al Dr. Francesco Brun, dell'ANAFI, 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.

Associazione Nazionale Frisone Italiana Via Bergamo,292 (loc.Migliaro) 26100 Cremona
Dott. Francesco Brun



0372 474214



centrogenetico@anafit.it

Il prossimo congresso SIET si terrà dal 30/9 al 1/10 sull'Altopiano di Asiago nel comune di Gallio (VI) grazie alla solerte organizzazione di Marcello Lora e Giuseppe Marcolin, che ringraziamo per l'impegno profuso, e verrà patrocinato dalle comunità locali, dalla Facoltà di Veterinaria di Padova e dall'Istituto Zooprofilattico delle Venezie. Le relazioni scientifiche programmate verteranno su programmi aziendali per il controllo della IBR-BVD (dott. Nardelli) e della Neospora (Prof. Capelli), rapporti utero-embrione (Prof. Gabai), impatto dell'ET sul miglioramento genetico a livello aziendale (Prof. Carnier), sviluppo di nuclei di selezione aziendali, ET nella pratica equina (Prof. Mari), applicazione

dell'ET sulla cavalla in USA (Texas), valutazione della qualità seminale e ottimizzazione dell'impiego del seme nell'ET. Al termine delle relazioni verrà, come da tradizione SIET, svolta una parte pratica che quest'anno sarà rivolta ad un approfondimento sulla valutazione del seme e sulle tecniche di congelamento.

E' previsto uno spazio per **comunicazioni libere**. Ti invitiamo, quindi, a preparare del materiale da proporre in modo che dubbi ed esperienze individuali diventino patrimonio della nostra collettività. Ti invitiamo, inoltre, a far pervenire suggerimenti e idee a: siet@unibas.it