



# News

## 2° Corso Base di Embryo Transfer a Select Breeders Services Italia

continua da pag. 7

“ricevente” ovuli in un periodo compreso fra un giorno prima e tre giorni dopo l’ovulazione della “donatrice”: è questo il motivo per cui il poter avere a disposizione più riceventi semplifica il lavoro del medico veterinario e permette al proprietario della “donatrice” di evitare perdite economiche dovute alla perdita di cicli per mancanza di “riceventi”. Il risultato dell’ET dipende ovviamente dal fatto che si reperisca un embrione trapiantabile, e pertanto l’utilizzo di materiale seminale di buona qualità aumenta la probabilità che la “donatrice” rimanga gravida e fornisca un embrione; è ovvio che, nel caso in cui si lavori su “donatrici” anziane o con stalloni con bassa fertilità, le percentuali di successo sono indubbiamente molto basse.

La “donatrice” può essere inseminata sia utilizzando seme fresco che refrigerato o congelato.

Il tentativo di recupero embrionale si effettua solitamente 7-8 giorni dopo l’avvenuta ovulazione, eseguendo ripetuti lavaggi dell’utero (solitamente 3 o 4) con soluzioni appositamente preparate. Il lavaggio uterino si effettua introducendo all’interno dell’utero un catetere, l’estremità del quale termina con un palloncino che viene insufflato con circa 80 ml di aria in modo da chiudere l’apertura della cervice ed impedire l’eventuale reflusso di liquido in vagina. Il liquido viene introdotto attraverso il catetere fino ad ottenere un discreto riempimento dell’utero e viene poi drenato “per caduta”. Dopodiché, il liquido di lavaggio così recuperato viene fatto passare attraverso un filtro che trattiene tutte le particelle di dimensioni uguali o superiori a quelle di un embrione. Dopo aver terminato il lavaggio uterino, il liquido rimasto nel filtro viene osservato al microscopio per identificare l’eventuale embrione. A questo punto, se la ricerca ha dato gli esiti sperati, si prospettano due opzioni: la prima consiste nel trasferire non-chirurgicamente l’embrione nell’utero della ricevente, utilizzando uno strumento molto simile a quello usato per l’inseminazione dei bovini, mentre la seconda è quella di refrigerare l’embrione ed inviarlo ad un centro che possiede un numero elevato di “riceventi” fra le quali si possa scegliere quella meglio sincronizzata con la “donatrice”. È ovvio che, come già accennato in precedenza, meno le ovulazioni di “donatrice” e “ricevente” sono sincronizzate, minori sono le probabilità di successo. Per questo motivo, e per il fatto che ogni “donatrice” dovrebbe avere a disposizione un numero cospicuo di “riceventi”, i proprietari di

cavalle da sottoporre a ET spesso preferiscono affittare la “ricevente” da centri specializzati che solitamente ne detengono un discreto numero. Nel caso in cui l’embrione venga refrigerato ed inviato ad un centro “riceventi”, viene trapiantato usando la modalità precedentemente descritta. Oltre a considerare il trasferimento di embrioni freschi o refrigerati, l’ET può anche prevedere il congelamento o la vitrificazione embrionale, tecniche che ne permettono la sopravvivenza per tempi illimitati.

In entrambi i casi l’embrione viene sottoposto a diversi passaggi in sostanze crioprotettrici che ne consentono la sopravvivenza, limitando i danni cellulari a cui è soggetto durante le fasi di congelamento e scongelamento. La vitrificazione è una tecnica introdotta solo recentemente, è di relativa facile applicazione e permette di ottenere risultati sovrapponibili a quelli del congelamento embrionale. Entrambe le tecniche portano a risultati accettabili solo se utilizzate su embrioni di dimensioni ridotte; per questo motivo il lavaggio uterino della “donatrice” deve essere effettuato 6 - 6,5 giorni dopo l’ovulazione e non dopo 7-8 come invece avviene nel caso in cui gli embrioni debbano essere trapiantati freschi. La diagnosi di gravidanza viene solitamente effettuata, tramite ecografia, 7-8 giorni dopo aver trasferito l’embrione all’interno dell’apparato riproduttivo della “ricevente” e, se la gravidanza viene confermata, la neo-gestante partorirà un puledro che possiede un patrimonio genetico completamente diverso dal suo.

È inoltre opportuno sottolineare che l’ET è una tecnica che prevede il trapianto di gameti (embrioni) ottenuti dalla fecondazione della cellula uovo da parte dello spermatozoo e non comporta nessuna manipolazione degli ovuli (oociti), come a volte viene erroneamente creduto. Le tecniche che prevedono la manipolazione di oociti sono infatti ben distinguibili dall’ET per le modalità con cui vengono eseguite: le più frequentemente utilizzate nella specie equina sono il Trapianto di Oociti o Oocyte Transfer (OT), l’Ovum Pick-Up (OPU), spesso associato all’Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI).

I motivi per cui l’ET può essere utilizzato da un allevatore sono molteplici. Ad esempio, visto che l’embrione viene prelevato dalla madre vera (genetica) 7-8 giorni dopo l’ovulazione per essere trasferito in una “ricevente”, la fattrice dalla quale l’allevatore desidera ottenere uno o più prodotti in un solo anno viene praticamente alleviata dal portare a

termine la gravidanza. Inoltre, fattrici atlete e performanti possono contemporaneamente gareggiare e produrre puledri. Ottime candidate per l’ET sono anche le fattrici sub-fertili, quelle anziane, quelle che hanno subito traumi durante il parto che ne hanno compromesso la capacità di portare a termine una gravidanza oppure quelle che nel corso degli anni hanno perso più volte “riassorbito” od abortito. I fattori influenzanti le percentuali di successo dell’ET sono molteplici e strettamente legati alla “donatrice”, alla “ricevente”, alla qualità dell’embrione nonché alla qualità del seme utilizzato. Ad esempio, cavalle anziane o con problemi di fertilità possono produrre embrioni di scarsa qualità e quindi ridurre le percentuali di riuscita della tecnica, oppure l’utilizzo di seme scarsamente qualitativo porta ad una scarsa probabilità che la “donatrice” rimanga gravida (e quindi ad una scarsa probabilità di recupero embrionale) anche se questa cavalla non ha alcun problema di fertilità. I libri genealogici che consentono alla stessa donatrice di produrre più puledri durante la stessa annata sono sempre più numerosi e per ottenere questo risultato è solitamente necessario recuperare dalla “donatrice” più embrioni in cicli successivi e trapiantarli in diverse “riceventi”. Una delle prime associazioni di razza che ha “legalizzato” la possibilità di produrre più gravidanze da ET dalla stessa “donatrice” e nella stessa annata è stata l’American Quarter Horse Association (AQHA). Per questo motivo la produzione tramite ET di puledri Quarter Horse è passata dagli 875 del 2002, anno in cui si è permesso di produrre più puledri dalla stessa cavalla, ai 1530 del 2003; da allora questa tecnica risulta sempre più impiegata dagli allevatori di Quarter Horse e i puledri originati da ET sono ora migliaia all’anno. Per quanto riguarda la realtà italiana, i dati che riguardano l’ET e che sono in nostro possesso si limitano agli anni compresi fra il 2001 e il 2004. Il numero di “donatrici” sottoposte ad ET in questo lasso di tempo è quasi raddoppiato, passando da 67 a 115 e la maggior parte di queste cavalle appartenevano a razze da salto oppure erano Quarter Horses.



# Newsletter

Gennaio 2008

## Indice

**Ne Serve Solo Uno... Vero?**  
Valutazione della qualità del materiale seminale e fertilità correlata  
Paul Loomis  
pagina 1

**Impiego di Nuove Tecniche Riproduttive**  
Ovum Pick Up e ICSI  
Sandro Barbacini  
pagina 1

**SBS Affiliate Focus Nuovi laboratori affiliati**  
Emerald Ridge Farm  
pagina 2

Mountain States Equine  
Reproduction Services  
pagina 2

**Laboratorio Mobile in Svezia**  
pagina 7

**2° Corso Base di Embryo Transfer**  
Denis Necchi  
pagina 7

**Select Breeders Services Italia**  
+39 0372 65101  
North America +1 410 658 3328  
Europe +39 0372 65224  
Australasia +61 03 58 299 566



Per ulteriori informazioni visitate il sito:

[www.selectbreeders.com](http://www.selectbreeders.com)

**Ricerca Stalloni**  
[www.siredirectory.com](http://www.siredirectory.com)

## Ne Serve Solo Uno... Vero?

**Valutazione della qualità del materiale seminale e fertilità correlata**

**Paul Loomis, Founder & CEO,**  
Select Breeders Service, Inc.

**Quanti spermatozoi servono per ottenere una gravidanza? Uno? 500 milioni? 100 milioni progressivamente motili? 600 milioni di spermatozoi progressivamente motili e morfologicamente normali? Un miliardo? Attualmente non è purtroppo possibile rispondere in modo adeguato a nessuna di queste domande. L’unica risposta che può essere data è.....“dipende”.**

La fertilizzazione è un fenomeno particolarmente complesso che vede implicati sia lo spermatozoo che l’oocita; entrambi sono dotati di una miriade di caratteristiche funzionali che devono essere perfettamente efficienti al momento opportuno e nel luogo preposto. È inoltre importante sottolineare che uno spermatozoo motile non è necessariamente uno spermatozoo fertile. Quanti spermatozoi devono pertanto essere depositati nell’utero della cavalla per conseguire una fertilità accettabile? Questa dovrebbe essere la base logica per determinare quanti spermatozoi dovrebbero essere contenuti in una dose di materiale seminale che sia commercialmente accettabile. Per questo motivo, l’unico modo per far sì che i proprietari di stallone e fattrice possano raggiungere il loro obiettivo comune (la gravidanza) è quello che ogni dose di materiale seminale contenga un numero sufficiente di spermatozoi perfettamente efficienti, così da portare al massimo le possibilità di ottenere una gravidanza. La correlazione tra il numero di spermatozoi contenuti in una dose inseminante e la fertilità di uno stallone può essere espressa da una curva

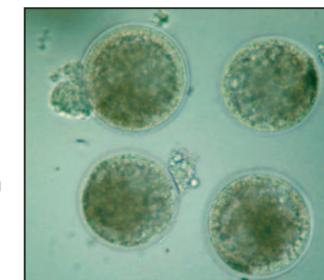
continua a pag. 4

## Impiego di Nuove Tecniche Riproduttive

**Ovum Pick Up e ICSI**

**Dr. Sandro Barbacini, SBS Italia**

L’Inseminazione Artificiale (IA) e l’Embryo Transfer (ET) sono state per molti anni le tecniche di riproduzione assistita (TRA) più utilizzate dall’industria allevatoriale equina, viceversa altre procedure, quali la produzione in vitro di embrioni, sono state adottate solo negli ultimi anni. Alcune recenti ricerche hanno infatti dimostrato come sia possibile ottenere gravidanze e produrre puledri dopo aver fecondato in vitro, tramite Iniezione Intracitoplasmatica di un unico Spermatozoo (ICSI), un



Blastocisti equine di 9 giorni prodotte tramite ICSI

continua a pag. 3



## SBS Affiliate Focus

### Mountain States Reproduction Services, LLC

Utah, USA



>> Per ulteriori informazioni

Dr. John Knowles, DVM, MS  
Farmington, Utah 84025  
+1 801 451-5530  
msrs@sdpbuffaloranch.com

Mountain States Reproduction Services, LLC (MSRS), Farmington, Utah, USA è situato fra il Great Salt Lake e le Wasatch Mountains, all'interno del bellissimo complesso equestre del Buffalo Ranch. MSRS offre a proprietari di stalloni e fattrici residenti in Utah, Idaho, Nevada, Wyoming, Colorado e aree circostanti servizi di congelamento materiale seminale ed embrioni.

La struttura è ufficialmente autorizzata a produrre materiale seminale congelato esportabile al di fuori degli USA e possiede tutto il "know how" per applicare procedure che permettono di eseguire i necessari controlli di qualità su tutta la catena produttiva. Il laboratorio di riproduzione è costituito da un'area destinata alla pulizia e preparazione della strumentazione necessaria ad eseguire il prelievo di materiale seminale, da un locale adibito alla raccolta del seme, da quattro sale per visita fattrici, da un laboratorio per trasferimento embrionale ed infine da una zona attrezzata con le



Per ulteriori informazioni  
sui 15 laboratori del  
Network:  
[www.selectbreeders.com](http://www.selectbreeders.com)

strumentazioni più all'avanguardia per manipolare, congelare ed analizzare materiale seminale equino. Inoltre, la distinta separazione dei singoli locali permette a MSRS di poter gestire, oltre alla attività di routine, anche tutte le fasi operative che devono essere svolte da un centro autorizzato all'import-export di materiale seminale.

Il fatto che personale tecnico adeguatamente addestrato possa utilizzare le tecnologie più avanzate permette a MSRS di offrire la più alta qualità nella gestione riproduttiva di stalloni e fattrici. I servizi dedicati alla fattrice includono la possibilità di eseguire valutazioni del potenziale riproduttivo, diagnosi di gravidanza e sessaggio fetale, nonché l'inseminazione artificiale con seme fresco, refrigerato o congelato e l'embryo transfer. I servizi dedicati agli stalloni includono invece valutazione del potenziale riproduttivo, raccolta e spedizione di seme refrigerato e congelamento, stoccaggio e distribuzione di materiale seminale equino.

### Emerald Ridge Farm

Ontario, Canada

Il nuovo laboratorio affiliato di Emerald Ridge Farm è dislocato in Canada nella contea di Wellington, alle porte di Guelph, nel cuore della zona dove l'industria equina canadese è più sviluppata. Emerald Ridge Farm è stata fondata nel 1998 ed ora il suo giro d'affari è cresciuto al punto da farlo diventare un centro di riproduzione equina in grado di poter ospitare stalloni residenti in una scuderia adiacente ad un centro di raccolta e produzione materiale seminale refrigerato e congelato. La scuderia principale ospita fino a 32 fattrici residenti e non, mentre durante la stagione riproduttiva viene utilizzata una struttura addizionale in modo da poter soddisfare ulteriori richieste.

Emerald Ridge Farm appartiene al Dr. Patrick Meyers e a sua moglie, Anna DeMarchi-Meyers. Il Dr. Patrick Meyers si è laureato in Medicina Veterinaria nel 1984 presso l'Università dell'Ontario ed ha approfondito i suoi studi nel settore della riproduzione dei grandi animali alla Texas A & M University dove, nel 1989, ha conseguito un titolo di specializzazione. Anna DeMarchi-Meyers ha invece ottenuto una laurea in Scienze Animali nel 1988, presso l'Università canadese di Guelph. Ha in seguito lavorato nell'industria farmaceutica equina fino al 2003 per poi indirizzare tutti i propri sforzi sulla gestione di Emerald Ridge Farm. Infine, svolge tuttora una attività di "free lance" che le permette di scrivere articoli sul benessere del cavallo che vengono pubblicati dalle riviste "Horse Care Magazine" e



>> Per ulteriori informazioni

Patrick J. Meyers, BS(Agr), DVM,  
MS, DACT  
Anna Meyers Bsc. (Agr)  
+1 516 836-8735  
patmeyers@hsfx.ca

"Harness Edge". Nel 2006, Emerald Ridge Farm diventa partner di Kentuckiana Farms, un centro stalloniero di cavalli da trotto ubicato negli USA a Georgetown, Kentucky, e attualmente gestisce un discreto numero di stalloni trottatori altamente qualitativi.



## Impiego di Nuove Tecniche Riproduttive

### Ovum Pick Up e ICSI

continua da pag. 3

giorni (preferibilmente 5 giorni). Nelle 57 sessioni di OPU eseguite, è stato possibile aspirare 953 follicoli e recuperare 559 oociti. Di questi, 366 (66%) hanno maturato e sono pertanto stati fertilizzati tramite ICSI; in totale sono state infine prodotte 49 blastocisti (0.85 blastocisti per sessione di OPU-ICSI-IVM). Al momento attuale sono stati scongelati e trapiantati non chirurgicamente 35 embrioni che hanno dato origine a 19 gravidanze. In seguito si sono verificate quattro morti embrionali, tre delle quali prima del trentesimo giorno di gravidanza ed una prima del sessantesimo. Ad oggi i puledri nati sono 10, mentre 5 gravidanze sono tuttora in corso. I risultati ottenuti in questo breve periodo di impiego commerciale hanno dimostrato che OPU, ICSI e IVM possono essere impiegati con successo su cavalle e stalloni di elevato pregio. Nonostante tutto però, OPU, ICSI e IVM non sostituiranno mai l'uso dell'Embryo Transfer convenzionale, visto queste tecniche possono essere portate a termine solo in presenza di attrezzature sofisticate e personale altamente specializzato.

**Tecniche di riproduzione assistita di livello avanzato quali l'OPU, l'ICSI e la IVM possono essere strumenti utilizzabili dall'allevatore nel caso in cui si renda necessario:**

- Ottenere gravidanze da cavalle Repeat Breeders (cavalle che non rimangono gravide nonostante non mostrino alcuna patologia);
- Ottenere gravidanze da cavalle che hanno problemi riproduttivi quali piometra (accumulo di pus in utero), endometriosi degenerativa (malattia cronica dell'utero) o lacerazioni cervicali non risolvibili;
- Ottenere puledri da cavalle che non sono in grado di portare a termine una gravidanza;
- Ottenere gravidanze producendo e congelando embrioni durante le fasi di transizione primaverile ed autunnale (durante questi periodi è possibile reperire un elevato numero di follicoli sulle ovaie delle cavalle);
- Utilizzare seme congelato che abbia una scarsa qualità post-scongelamento o una bassa fertilità in vivo.

## SBS Sweden Aggiunge il Servizio di Laboratorio Mobile

### Nuovo laboratorio su quattro ruote in Svezia



Select Breeders Service Sweden ha attivato il nuovo laboratorio mobile per il congelamento di materiale seminale equino. Con questo nuovo laboratorio la Dottoressa Kerstin Darenius può offrire ai proprietari di stalloni il congelamento di seme a domicilio. Il laboratorio mobile offre una alternativa conveniente per i proprietari di stalloni che vogliono continuare a mantenerli in addestramento presso le loro strutture. Il laboratorio è ufficialmente approvato dal Ministero della Salute Svedese per produrre materiale seminale equino da movimentare all'interno della Unione Europea. È interessante sottolineare che la Svezia è l'unico paese comunitario che permette di produrre seme equino tramite l'utilizzo di un laboratorio mobile.

Per maggiori informazioni e per prenotare una visita a domicilio:  
Dr. Darenius at 0046-705736772 or [kerstin\\_darenius@yahoo.se](mailto:kerstin_darenius@yahoo.se).

## 2° Corso Base di Embryo Transfer a Select Breeders Services Italia

Dr. Denis Necchi, SBS Italia

Nei giorni 21 e 22 settembre si è tenuto, presso la struttura di Select Breeders Services Italia, il secondo corso di Embryo Transfer (ET) per medici veterinari. Il corso è stato strutturato in due giornate: una teorica, che si è tenuta a Cremona nella sede di SIVE (Società Italiana Veterinari per Equini) ed una pratica, che si è invece svolta a San Daniele Po, nella sede di SBSItalia. Al corso, hanno partecipato 12 medici veterinari provenienti da tutta Italia, mentre le lezioni e le esercitazioni pratiche sono state tenute da 5 relatori-istruttori (Sandro Barbacini, Francesco Camillo, Cesare Galli, Giovanna Lazzari e Denis Necchi). Durante le lezioni, oltre alla descrizione teorico-pratica della tecnica convenzionale di ET, sono state presi in considerazione anche metodi di riproduzione assistita avanzati quali l'Ovum Pick-Up (OPU), l'ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection), il congelamento e la vitrificazione embrionale. L'ET è senza dubbio una tecnica di riproduzione assistita che riscuote un grande interesse sia nell'ambito scientifico che in quello allevatorio. Infatti, i progressi che si sono verificati nella gestione delle cavalle prima, durante e dopo il trapianto embrionale hanno consentito un continuo affinamento della metodica, che le ha consentito di acquisire una notevole diffusione fra gli allevatori di tutte le razze equine. Da un punto di vista tecnico l'esecuzione dell'ET prevede l'utilizzo di una cavalla "donatrice", dalla quale vengono prelevati uno o più embrioni, e di una o più cavalle "riceventi" nelle quali gli embrioni vengono poi trasferiti. Il numero di embrioni recuperabili da una "donatrice" è fisiologicamente vincolato al numero di oociti che la cavalla è in grado di ovulare in un singolo "calore". A differenza del bovino, dove esistono tecniche di super-ovulazione in grado di provocare l'ovulazione di 10-15 oociti per "calore" ed eventualmente l'ottenimento di 10-15 embrioni per sessione di ET, nella cavalla è possibile sfruttare solo le ovulazioni naturali (solitamente una, a volte due, più raramente tre per "calore"). Per eseguire un ET è innanzitutto necessario che i "calori" e le ovulazioni di "donatrice" e "ricevente" siano sincronizzati al meglio. Per questo motivo e' basilare avere a disposizione almeno due o tre "riceventi", in modo da poter scegliere quella la cui ovulazione è meglio sincronizzata con quella della "donatrice". Al fine di ottenere una perfetta sincronizzazione è fondamentale che la

continua a pag. 8

## Ne Serve Solo Uno...

continua da pag. 5

che è necessario per ottenere la massima fertilità per la maggior parte degli stalloni. Se si analizza infatti il grafico contenuto nella figura 1, risulta evidente che, nel caso in cui le dosi inseminanti di ogni soggetto preso in considerazione contenessero 300 milioni di spermatozoi progressivamente motili, si potrebbe ottenere la massima fertilità da tutti gli stalloni.

### Quali altri fattori sono in grado di influenzare la probabilità che una fattrice risulti gravida dopo essere stata inseminata con il seme congelato di uno stallone?

Fino ad ora, in questo articolo, ci siamo concentrati principalmente sui fattori della fertilità inerenti al seme ed allo stallone; non dobbiamo trascurare però il fatto che per ottenere una gravidanza entrano in gioco altre variabili. In particolar modo, è necessario non dimenticare che la fertilità è il prodotto delle singole fertilità di fattrice e stallone (e quindi dei loro gameti). (vedi riquadro)  
Al momento attuale, purtroppo, l'unico test che consente di poter stabilire quale sia la fertilità del seme congelato (ma anche del seme fresco e refrigerato) di un determinato stallone è la prova biologica: ovvero la determinazione delle percentuali di gravidanza ottenute con l'utilizzo del suo materiale seminale.

Per dimostrare che uno stallone è più o meno fertile, un proprietario potrebbe riportare le percentuali di gravidanza ottenute dopo aver inseminato 5, 10 o 20 fattrici. Visto però che la fertilità ottenuta dopo inseminazione è una funzione binaria (gravida o non gravida), è come se si lanciasse una moneta (testa o croce). Quando si lancia una moneta e si misurano i risultati, si può notare che più volte la si lancia e più ci si avvicina alla possibilità di conseguire il risultato percentuale più reale (50%).

Analizziamo ora l'esempio di due stalloni (A e B) che hanno la stessa fertilità (50%) e che vengono utilizzati per inseminare 10 fattrici ciascuno. La fertilità che viene invece osservata utilizzando lo stallone A è del 70% (7 gravidanze su 10 cavalle) mentre quella dello stallone B è solo del 30%. Nonostante tutto però, da un punto di vista statistico, lo stallone A non è più fertile dello stallone B: questa imprecisione nella valutazione dei valori di fertilità è dovuta unicamente alle variazioni

binarie. In altre parole, esiste la probabilità che, assegnando agli stessi stalloni A e B altre 10 fattrici da inseminare si verifichi l'esatto contrario, e cioè che lo stallone A possa ottenere 3 gravidanze su 10 e lo stallone B 7 su 10. L'unico modo per ottenere risultati che corrispondano il più possibile alla fertilità reale di uno stallone è pertanto quello di aumentare il numero di cavalle fecondate.

### Cosa significa tutto questo?

In conclusione si può affermare che:

1. La fertilità è un fenomeno complesso che dipende da molti fattori, strettamente legati sia alle fattrici che agli stalloni. Molti di questi fattori sono già noti (ma resta comunque ancora difficile valutare il loro impatto sulla fertilità) mentre altri, probabilmente altrettanto importanti, restano ancora sconosciuti.
2. Il numero ottimale di spermatozoi necessari ad ottenere una gravidanza è diverso per ogni stallone e pertanto i centri di produzione dovrebbero produrre dosi inseminanti che contengano un numero di spermatozoi superiore a quello minimo necessario ad ottenere la massima fertilità. Tutto ciò è necessario anche perché si deve tener conto di tutte le variabili di fertilità non controllabili che si osservano nell'attività pratica (cavalle anziane o meno fertili, materiale stoccato o scongelato utilizzando modalità non adeguate, etc.).
3. Le procedure standard di laboratorio utilizzate per la valutazione qualitativa del materiale seminale possono essere fuorvianti o soggette ad errori di sistema o imprecisioni.

## La matematica della fertilità

Al fine di comprendere questo esempio, dimentichiamoci totalmente dell'importante significato delle "altre variabili" e supponiamo che:

**Fertilità Osservata = fertilità stallone x fertilità fattrice**

Una fertilità ottenuta sul campo del 50% (0,50) può risultare dal fatto che uno stallone con il 55% di fertilità venga accoppiato con una cavalla che abbia il 90% di fertilità ( $0,55 \times 0,9 = 0,49$  o 49%) e viceversa. Anche nel caso in cui uno stallone estremamente fertile sia usato per "coprire" una fattrice molto fertile (entrambi con una fertilità del 90%) la probabilità che la fecondazione abbia luogo non sarà del 100%, bensì dell'81% ( $0,9 \times 0,9 = 0,81$  o 81%). Non dimentichiamo comunque che stiamo totalmente ignorando l'influenza delle "altre variabili" significative. Per esempio, accoppiare una fattrice anziana e presumibilmente sub-fertile con uno stallone sub-fertile (o con un seme di scarsa qualità) diminuisce di molto le probabilità di ottenere una gravidanza. Fertilità della cavalla (40%) x fertilità dello stallone (40%) = 16% è la probabilità che si instauri una gravidanza.

4. La fertilità del materiale seminale non può essere garantita basandosi unicamente sulle analisi di laboratorio. Tutte le analisi effettuate in laboratorio misurano solo alcuni aspetti relativi all'integrità della cellula spermatica e non è detto che possano essere in grado di predire la sua fertilità.
5. Lo scopo per cui si deve eseguire una valutazione qualitativa del materiale seminale è quello di misurare con precisione ed accuratamente tutte le caratteristiche spermatiche possibili, al fine di identificare gli stalloni od i lotti di seme che probabilmente avranno un basso livello di fertilità. Di conseguenza questi stalloni o questi lotti di materiale seminale dovrebbero essere eliminati dalla distribuzione commerciale.
6. I proprietari delle fattrici che prendono accordi per utilizzare il seme (refrigerato o congelato) di un determinato stallone dovrebbero essere a conoscenza dei numerosi fattori che sono in grado di influenzare i risultati. Acquisire materiale seminale congelato "a dose" e senza avere alcuna garanzia di fertilità o di qualità è un grosso rischio per il proprietario della fattrice. Nel caso in cui il seme sia venduto "a dose" il venditore dovrebbe assolutamente garantire che ogni dose inseminante contenga un numero minimo di spermatozoi ed abbia una percentuale minima di spermatozoi progressivamente motili post-scongelo. SBS auspica che il seme congelato venga usato come uno strumento efficiente per "fornire" materiale seminale ad una cavalla, in modo da rispettare le condizioni di un contratto di acquisto che garantisca una gravidanza.

## Impiego di Nuove Tecniche Riproduttive

### Ovum Pick Up e ICSI

continua da pag. 1

oocita immaturo che sia stato raccolto tramite Ovum Pick Up (OPU) e successivamente maturato in vitro (IVM). Gli embrioni così ottenuti possono essere immediatamente trasferiti in riceventi opportunamente sincronizzate, oppure congelati e trapiantati in un secondo tempo. L'OPU è una tecnica che è stata impiegata per la prima volta 15 anni orsono da ricercatori Americani ed Australiani e permette di raccogliere gli oociti direttamente dai follicoli ovarici, tramite l'utilizzo di una sonda ultrasonografica trans-vaginale. L'OPU può essere eseguito sulla stessa cavalla ogni 15 giorni, anche per 5-6 volte consecutive, senza causare alcun effetto collaterale negativo. Per eseguire la raccolta degli oociti è necessario posizionare l'ovaio della cavalla, tramite manipolazione trans-rettale, a contatto con la sonda ecografica trans-vaginale che è stata precedentemente introdotta all'interno della vagina della cavalla donatrice. A questo punto si fa avanzare all'interno della sonda un ago "speciale" con il quale si penetrano i follicoli ovarici ed attraverso il quale viene fatto defluire un liquido di coltura in modo da "lavarli" ed aspirare gli oociti. La procedura viene ovviamente eseguita su entrambe le ovaie.

Al momento attuale l'OPU viene in particolar modo utilizzato per aspirare oociti maturati in vivo da follicoli pre-ovulatori: gli oociti vengono quindi trapiantati nella tuba di una ricevente (trapianto di oociti) che è stata fecondata nel momento in cui la cavalla donatrice avrebbe ovulato.



Sopra:

Primo puledro nato dalla produzione commerciale di embrioni creati tramite ICSI e trapiantato dopo congelamento-scongelo. Ricevente (Aveglinese) e puledro (Argentinus x Zeus) 7 giorni dopo la nascita (2005)

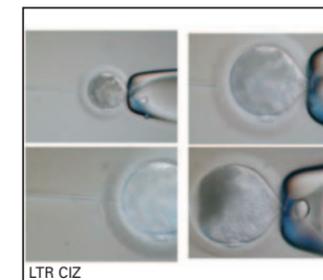
Sotto:

Lo stesso puledro a 2 anni di età.



somministrazione di sostanze ormonali) a produrre più follicoli durante un "calore". Questo aspetto è particolarmente importante nella specie equina, visto che tuttora non esiste alcun trattamento farmacologico che permetta di superovulare (far produrre più follicoli e quindi ovulazioni) una cavalla. Nel 2001, Select Breeders Services Italia ha iniziato a collaborare con il Laboratorio di Tecnologie della Riproduzione - CIZ (LTR-CIZ). LTR-CIZ è un laboratorio di livello internazionale dove un gruppo di ricercatori guidati dal Dr. Cesare Galli

L'utilizzo di questa tecnica risulta, come dimostrato da ricercatori dell'Università del Colorado, in soddisfacenti percentuali di gravidanza, sempre che non venga applicata su cavalle anziane che producono oociti alterati. L'ICSI è una tecnica di laboratorio estremamente moderna che permette di fertilizzare in vitro un oocita, iniettando un solo spermatozoo al suo interno. Al contrario di quanto si verifica con il trapianto di oociti (per il quale si utilizza un elevato numero di spermatozoi per ottenere una gravidanza), l'ICSI permette di ottenere puledri utilizzando materiale seminale a bassa motilità e/o a bassa fertilità in vivo. Quando OPU, IVM e ICSI vengono utilizzati contemporaneamente danno il considerevole vantaggio di non dover in alcun modo stimolare la donatrice (tramite la



ICSI: iniezione di uno spermatozoo all'interno di oocita maturato in-vitro

eseguono ricerche nei settori della biotecnologia e delle TRA applicate a varie specie di animali domestici. Questa collaborazione è iniziata ponendosi l'obiettivo di mettere a punto una tecnica OPU-ICSI-IVM che potesse permettere di ottenere buoni risultati in termini di gravidanze. Dopo aver realizzato alcuni esperimenti preliminari, nel periodo 2004-2007 LTR-CIZ e SBSItalia hanno eseguito 57 OPU commerciali su 35 cavalle donatrici di età compresa fra i 3 ed i 24 anni ed appartenenti a più razze. L'ICSI è stato eseguito utilizzando materiale seminale congelato di varia qualità e fertilità, appartenente a 27 stalloni. Durante la stagione di monta le cavalle sono state sottoposte a OPU in diestro (fuori dal "calore") e senza che fosse presente sulle loro ovaie un follicolo dominante. Durante l'esecuzione dell'OPU si è provveduto ad aspirare tutti i follicoli ovarici la cui dimensione fosse compresa fra i 0,5 ed i 4 cm di diametro, nel tentativo di ottenere il più alto numero possibile di oociti. Tutti gli oociti che sono stati recuperati tramite OPU sono stati sottoposti a maturazione in vitro e quelli maturati sono stati quindi

fertilizzati in vitro tramite ICSI e messi in coltura fino a quando avessero raggiunto lo stadio di blastocisti (embrione di 7-8 giorni). Gli embrioni così prodotti sono stati congelati in un medium di coltura contenente il 10% di glicerolo e successivamente mantenuti in azoto liquido. Gli embrioni sono stati congelati 6, 7, 8 o 9 giorni dopo l'ICSI, in base al periodo di tempo da loro impiegato a raggiungere lo stadio di blastocisti. Gli embrioni sono stati quindi trapiantati non chirurgicamente in cavalle riceventi che avessero ovulato spontaneamente da 4-6

continua a pag. 7



www.selectbreeders.com

## Ne Serve Solo Uno...

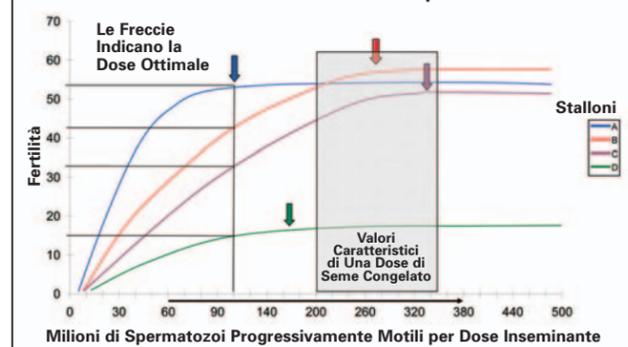
continua da pag. 1

(fig. 1) e, nell'esempio raffigurato nel diagramma, il modo in cui si sviluppano le curve ed il livello massimo di fertilità sono differenti per i quattro stalloni presi in considerazione.

Nella figura 1, lo stallone A arriva ad ottenere la massima fertilità con un numero di spermatozoi inferiore rispetto agli stalloni B, C e D e comunque, anche se si aumentasse il numero di spermatozoi presenti in ogni dose inseminante, non si riuscirebbe ad ottenere alcun incremento della sua fertilità.

Come rappresentato nella fig. 1, la dose inseminante appropriata per lo stallone A dovrebbe essere di 100 milioni di spermatozoi progressivamente motili. Lo stallone B raggiunge invece un livello superiore di

**figura 1** Grafico Teorico Rappresentante la Fertilità come Funzione del Numero di Spermatozoi



fertilità, ma solo quando si impiegano un numero maggiore di spermatozoi per dose inseminante. Inoltre, nel caso in cui si utilizzasse una dose inseminante di 100 milioni di spermatozoi progressivamente motili per tutti gli stalloni inclusi nel nostro esempio, si otterrebbero percentuali di fertilità molto diverse (53% per A, 42% per B, 32% per C e 15% per D). Aumentando invece il numero di spermatozoi progressivamente motili a 250 milioni per dose inseminante non si osservano cambiamenti per lo stallone A, mentre gli stalloni B e C incrementerebbero notevolmente la loro fertilità. Lo Stallone C potrebbe raggiungere gli stessi valori di fertilità dello stallone A, ma solo nel caso in cui si aumentasse il numero di spermatozoi contenuti in ogni dose inseminante. Lo stallone D, infine, ha un picco massimo di fertilità molto basso, che non può essere incrementato nemmeno utilizzando un numero maggiore di

spermatozoi per dose inseminante. Ciò è dovuto al fatto che alcuni difetti delle cellule spermatiche sono compensabili aumentando il numero di spermatozoi presenti in una dose inseminante, mentre altri (come probabilmente quelli degli spermatozoi dello stallone D) non lo sono affatto (vedi riquadro).

**Qual è il motivo per il quale il materiale seminale di stalloni differenti può possedere una fertilità totalmente diversa, anche se usato su fattrici gestite nello stesso modo dal punto di vista riproduttivo?**

La risposta a questa domanda sta nel fatto che in realtà la fertilità di uno stallone non è semplicemente determinata dal numero totale di spermatozoi impiegati, ma dal numero di

spermatozoi in grado di fertilizzare che sono presenti nella dose inseminante. Uno spermatozoo competente (capace di fecondare un oocita) deve possedere tutte le caratteristiche funzionali necessarie alla fertilizzazione. Un esempio è la motilità spermatica, caratteristica funzionale che uno spermatozoo deve avere per essere in grado di fecondare un oocita dopo che è stato introdotto nell'apparato

genitale femminile tramite inseminazione uterina. Di conseguenza, per fare in modo che uno stallone con il 30% di motilità spermatica abbia la stessa fertilità di uno con il 60% di motilità, basterebbe che le dosi inseminanti del primo contenessero il doppio di spermatozoi di quelle del secondo. Se la motilità fosse l'unico parametro indispensabile che uno spermatozoo deve possedere per fertilizzare un oocita, questo semplice esempio potrebbe anche corrispondere alla verità. Purtroppo però, la realtà non è proprio questa: la misurazione della motilità spermatica, per quanto sofisticata possa essere, non corrisponde alla fertilità. Infatti, uno spermatozoo con scarsa motilità può essere fertile, mentre uno ad elevata motilità può invece non esserlo. Oltre alla motilità progressiva, uno spermatozoo in grado di fecondare, deve anche possedere specifiche caratteristiche morfologiche quali membrane cellulari plasmatiche ed acrosomiali integre che

## Difetti compensabili e non compensabili

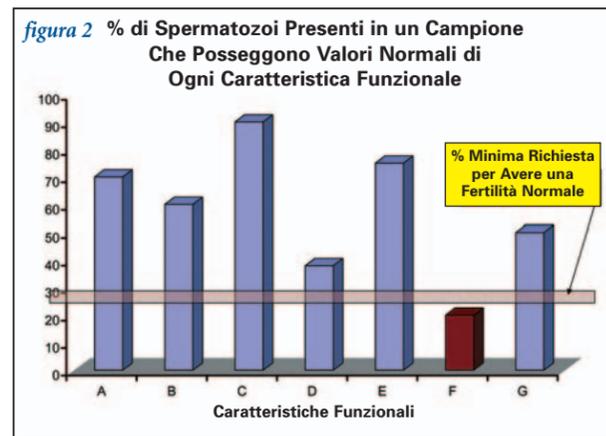
**“Se il 30% di motilità post-scongelo è un parametro accettabile ed un campione di materiale seminale possiede il 15%, qual è il motivo per il quale non si può semplicemente raddoppiare il numero di paillette necessarie ad una inseminazione?”**

In realtà, per alcuni stalloni è possibile..... ma per altri si può raddoppiare, triplicare od anche incrementare di 10 volte il numero di spermatozoi inseminanti, senza però riuscire ad aumentare in alcun modo la fertilità. Da un'analisi della figura 1, si evince che si potrebbe significativamente aumentare la fertilità degli stalloni B e C raddoppiando il numero degli spermatozoi/dose da 100 a 200 milioni; cosa questa che viceversa non avrebbe alcun effetto sulla fertilità dello stallone D. Ogni campione di seme contiene sempre spermatozoi con alterazioni morfo-funzionali e pertanto la proporzione che esiste fra normali ed anormali nella dose inseminante ne determina la fertilità. Tra i possibili difetti spermatici ve ne sono alcuni molto importanti ed altri che lo sono meno. Ad esempio, alcuni difetti limitano la capacità dello spermatozoo di penetrare l'oocita e quindi di fecondarlo: tali spermatozoi non saranno in grado di partecipare alla fertilizzazione e saranno pertanto incapaci di competere con gli spermatozoi normali presenti nello stesso eiaculato. Questo tipo di difetti viene definito "compensabile" perché si può compensare la fertilità degli spermatozoi aumentando il loro numero, fino a raggiungere una quantità di spermatozoi competenti (capaci di fecondare un oocita) all'interno della dose inseminante. Viceversa, altri tipi di difetti (quelli non "compensabili") non impediscono allo spermatozoo di penetrare e fecondare la cellula uovo, ma condizionano gli avvenimenti successivi alla fecondazione e portano ad una morte embrionale precoce. Questi spermatozoi sono in grado di competere con gli spermatozoi "compagni di viaggio" normali e potenzialmente hanno le stesse probabilità di penetrare la cellula uovo. In questo caso, se si aumentasse il numero di spermatozoi presenti nella dose inseminante, non si otterrebbe una maggior probabilità che un oocita possa essere fecondato da uno spermatozoo totalmente competente, visto che la proporzione tra spermatozoi normali ed anormali resta invariato. Pertanto questo tipo di difetto rimane "non compensabile", in quanto non è possibile migliorare la fertilità aumentando il numero di spermatozoi presenti nella dose inseminante.

gli permettano di entrare in contatto con l'oocita e di penetrarne la membrana cellulare, od altre ancora non ben definite e parzialmente sconosciute. (vedi fig. 2 per una rappresentazione del concetto). La maggior parte dei centri di produzione di materiale seminale congelato producono le dosi inseminanti basandosi sul numero di spermatozoi progressivamente motili presente allo scongelamento ed in alcuni casi prendono in considerazione anche la

percentuale di spermatozoi morfologicamente normali. Nonostante tutto però, anche l'utilizzo di un numero adeguato di spermatozoi che posseggano queste due caratteristiche funzionali non garantisce che questa dose inseminante sia fertile. L'utilizzo di una dose di materiale seminale che contenga, post-scongelo, un numero adeguato di spermatozoi progressivamente motili e morfologicamente normali riduce solamente al minimo la probabilità che l'infertilità sia il risultato di anomalie di questi due attributi (vedi fig. 2 per una rappresentazione del concetto). Un'ulteriore metodo che si utilizza per standardizzare la qualità del seme è quello di valutarla nel modo più preciso ed accurato possibile, impiegando procedimenti di laboratorio standardizzati. Il seme congelato è solitamente venduto con la garanzia (o diritto di non-garanzia) che, dopo lo scongelamento, ogni dose inseminante contenga almeno un numero x di milioni di spermatozoi totali che abbiano una percentuale x di motilità progressiva.

In molti laboratori dove viene prodotto materiale seminale congelato, la motilità viene valutata attraverso la stima soggettiva del numero di spermatozoi che attraversano linearmente il campo di visualizzazione del microscopio. È chiaro che una stima della motilità spermatica effettuata in questo modo, proprio per la sua soggettività, viene estremamente influenzata dall'esperienza di chi analizza il campione ed è molto meno precisa di una valutazione eseguita impiegando un sistema computerizzato (CASA, Computer Assisted Semen Analysis). Un altro fattore



**Figura 2**

Supponiamo che uno spermatozoo possieda 7 caratteristiche funzionali che siano necessarie alla fertilizzazione (caratteristiche A-G: A = motilità, B = morfologia, etc.) e che noi, attraverso sofisticate analisi di laboratorio, fossimo in grado di misurare con esatta precisione questi parametri ed in grado di ben distinguere gli spermatozoi normali da quelli anormali. (Questa è chiaramente una semplificazione estrema, visto che vengono presi in considerazione un numero di parametri molto elevato e dei quali oggi non conosciamo). Se un campione di materiale seminale contenesse soprattutto spermatozoi normali per le caratteristiche A, B, C, D, E ed F ed anormali per G, questo campione dovrebbe essere considerato non fertile; lo stesso sarebbe se un campione contenesse soprattutto spermatozoi normali per le caratteristiche A, B, C, D, E e G ed anormali per F. Se si valutasse solo la caratteristica A, si prenderebbe in considerazione solamente la motilità spermatica, mentre determinare solo motilità e morfologia spermatica significherebbe vagliare solo A e B, e così via. Se si tenesse in considerazione quanto rappresentato nella figura, la maggior parte dei centri di produzione potrebbero identificare il campione come non idoneo solo se il parametro F corrispondesse alla motilità o alla morfologia. Essere in grado di prevedere la fertilità del materiale seminale, significa avere la possibilità di misurare e valutare tutti le caratteristiche funzionali degli spermatozoi. Purtroppo però, dopo aver identificato le procedure per valutare una nuova caratteristica funzionale, l'unico obiettivo realizzabile è quello di provare e vedere se i campioni di materiale seminale appartenente a vari stalloni possano essere sub-fertili a causa dell'anormalità di questa caratteristica funzionale.

fondamentale per arrivare a determinare il numero preciso di spermatozoi che saranno contenuti nella dose inseminante, è la metodica con cui viene effettuata la misurazione iniziale e post-diluizione della concentrazione spermatica. Una scarsa accuratezza nella fase di conta degli spermatozoi o l'utilizzo di strumenti inappropriati, portano inevitabilmente ad ottenere una concentrazione spermatica non adeguata a quella che dovrebbe essere contenuta nella dose inseminante. (Per avere ulteriori informazioni sulle metodiche che i laboratori Select Breeders Services utilizzano per assicurare il più elevato standard di qualità possibile, si consiglia di far riferimento all'articolo pubblicato sulla newsletter di Primavera 2007).

Idealmente, chi produce materiale seminale congelato vorrebbe essere in grado di determinare il numero esatto di spermatozoi necessari ad ottenere la massima fertilità da ogni stallone, e poter pertanto produrre le dosi inseminanti sulla base di questa informazione. Purtroppo però, per identificare il numero esatto di spermatozoi necessari ad ottenere la massima fertilità da ogni stallone, bisognerebbe inseminare con dosi contenenti quantità diverse di spermatozoi un discreto numero di cavalle gestite nello stesso modo. È evidente che il mettere in atto una procedura del genere comporterebbe costi inaccettabili per l'industria allevatoria equina. Di conseguenza, i centri di produzione forniscono solitamente dosi inseminanti che contengono un numero di spermatozoi superiore a quello

continua a pag. 6



[www.selectbreeders.com](http://www.selectbreeders.com)