

MOTILITÀ IPERATTIVATA/IPERMOTILITÀ ED

UTILIZZO DEI SISTEMI CASA

La motilità progressiva è una caratteristica funzionale degli spermatozoi umani che regola la loro capacità di migrare attraverso il muco cervicale, risalire attraverso i differenti distretti dell'apparato riproduttivo femminile, penetrare la zona pellucida ed in ultima analisi fecondare l'ovocita.

La motilità iperattivata è una proprietà specifica acquisita dagli spermatozoi lungo il processo di capacitazione che li rende in grado di essere "fecondanti". La possibilità che uno spermatozoo motile sia ipermotile è un passaggio cruciale perché lo stesso possa fecondare l'ovocita. Questa caratteristica dipende prevalentemente dalla concentrazione di calcio intracellulare e dai livelli di cAMP.

Quando si applicano le differenti tecniche di riproduzione assistita, a prescindere dal livello di complessità delle stesse, la capacitazione avviene artificialmente in laboratorio, generalmente ricorrendo a centrifugazioni su gradiente di densità o a separazione per migrazione in base ai parametri del campione seminale di partenza.

Tuttavia nella sospensione di nemaspermi ottenuti non è sempre facile discriminare tra le forme mobili che abbiano le caratteristiche di ipermotilità attese.

Utilizzando il sistema più comune di analisi computerizzato dello sperma (Computer-aided Sperm Analysis, acronimo CASA), è possibile l'esecuzione di valutazioni affidabili delle caratteristiche del movimento degli spermatozoi ("cinematica") nel liquido seminale. Il protocollo può essere utilizzato anche con sospensioni di spermatozoi lavati in cui è possibile discriminare tra percentuali di spermatozoi mobili e progressivamente mobili. Utilizzando la tecnologia CASA è anche possibile identificare biologicamente, e quindi clinicamente, importanti sottopopolazioni di spermatozoi - ad esempio quelli con buone caratteristiche di iperattivazione.

La tecnologia computer-aided per l'analisi dello sperma (CASA) è stato sviluppato alla fine del 1980 per analizzare caratteristiche di movimento degli spermatozoi ed ha avuto molto successo nell'ampliare questo campo di ricerca. CASA è stato utilizzato anche con successo per la misura di caratteristiche del liquido seminale come la concentrazione di spermatozoi e le proporzioni relative di motilità progressiva in molte specie animali trovando vasta applicazione nei laboratori di produzione di animali domestici e di tossicologia riproduttiva. Tuttavia, i tentativi di utilizzare

CASA per l'analisi del seme in ambito clinico sull'umano hanno incontrato scarso successo a causa delle difficoltà intrinseche presentate dall'analisi di molti campioni di sperma umano e dovuti prevalentemente ad aggregazioni e detriti che, fino ad ora, hanno precluso un'accurata analisi di immagine digitale. Inoltre in ambito clinico diagnostico la condizione seminale di base è favorevole ad una conta e valutazione della motilità di tipo computerizzato mentre in ambito di riproduzione assistita i parametri del campione sono spesso così alterati da sfuggire alla standardizzazione tipica degli algoritmi e necessitare di una valutazione microscopica accurata.

Nonostante l'analisi del liquido seminale attraverso l'utilizzo del CASA si siano evoluti nel corso di circa 30 anni sia attraverso i progressi dei dispositivi per catturare l'immagine dal microscopio che con l'aumento sorprendente delle potenzialità di calcolo dei sistemi informatici e dei software applicativi, i concetti di base per valutare gli spermatozoi ed i loro schemi di movimento sono cambiati ben poco. Ogni sistema commercializzato è differente ma i principi costitutivi sostanzialmente non lo sono. I moderni sistemi CASA possono visualizzare automaticamente più campi in una camera registrando il numero contemporaneo ed il movimento da 500 fino ad oltre 2000 spermatozoi, catturando fino a 50/60 fotogrammi al secondo. Quando la metodologia è accuratamente convalidata, gli attuali sistemi CASA forniscono, specialmente in ambito riproduttivo veterinario, informazioni importanti per la garanzia della qualità dello sperma previste dal marketing, tuttavia nella routine clinica di un laboratorio di fecondazione assistita le possibilità predittive dell'analisi computerizzata restano limitate.

Tra i vari gruppi che si sono dedicati alla valutazione dell'applicazione dei sistemi CASA, uno dei maggiori risulta quello di David e Sharon Mortimer. Nel più completo degli studi condotti, gli autori hanno analizzato le funzionalità migliorate di due piattaforme CASA moderni (Hamilton Thorne CASA-II e Microptic SCA6) e preso in considerazione le loro applicazioni attuali e future, con particolare riferimento all'utilizzo di questa tecnologia per valutazioni di tipo funzionale piuttosto che semplici caratteristiche descrittive degli spermatozoi.

Chiaramente in una camera di conta le condizioni di studio del movimento degli spermatozoi sono un compromesso poiché gli spermatozoi sono osservati in situazioni ben diverse da qualsiasi altra incontreranno in vivo. In particolare la sospensione viene visualizzato in una camera di conta in cui i nemasperi nuotano diversamente a seconda che si trovino nella porzione centrale o vicino all'interfaccia aria/sospensione. Le leggi dell'ottica impongono una profondità minima di campo in cui un spermatozoo oggetto di osservazione può essere rilevato nel suo movimento pertanto sono necessari sistemi sofisticati in grado di rilevare il movimento degli spermatozoi in tre dimensioni. Tuttavia è improbabile che il passaggio dagli attuali approcci disponibili alla misurazione del

movimento degli spermatozoi in una camera di conta più adeguata possa migliorare o sostituire il processo decisionale sulla scelta della tecnica di riproduzione assistita da applicare.

Alcuni studi hanno suggerito che l'analisi del liquido seminale attraverso il CASA, in funzione delle relative caratteristiche di concentrazione e ipermotilità, identificata come sottopopolazione degli spermatozoi mobili, siano legati ai tassi di fecondazione in vitro. Tuttavia, è stato anche suggerito che il maggior numero di parametri di motilità valutati da CASA non implica necessariamente una maggiore precisione nel predire la fertilità.

Gli studi effettuati si sono prevalentemente focalizzati sui tassi di fecondazione di ovociti in cicli di fecondazione in vitro prodotti utilizzando spermatozoi di cui fosse stata valutata tramite CASA la tipologia di movimento dopo selezione con swim-up. I risultati in piccole coorti di pazienti indicano correlazioni significative tra i tassi di fecondazioni e le stime CASA soprattutto per i parametri che riguardano l'ampiezza dello spostamento laterale della testa (AHL), la velocità curvilinea (VCL), la velocità in linea retta (VSL), la velocità media di percorso (VAP) ed in particolare il movimento rapido. Tuttavia mancano studi solidi che correlino i tassi di fecondazione all'outcome del trattamento e soprattutto resta la problematica della valutazione "a campione" della sospensione di nemaspermi in quanto l'aliquota utilizzata per l'inseminazione non è mai la medesima analizzata.

La letteratura evidenzia inoltre che, benchè nella routine della diagnostica clinica il CASA abbia trovato vasta applicazione, tuttavia gli operatori dei laboratori hanno una conoscenza relativa sui principi di funzionamento del CASA, i fattori che ne influenzano l'attendibilità e di conseguenza la necessità formativa. Questi fattori, uniti alla mancanza di un controllo interno adeguato possono risultare in differenze interpretative anche molto grandi fra differenti laboratori. Pertanto in ambito clinico l'utilizzo dei sistemi CASA non può prescindere dalla standardizzazione e dal controllo di qualità.

BIBLIOGRAFIA

1. Yanagimachi R (1994). Mammalian fertilization. In: "The Physiology of Reproduction", E. Knobil and JD Neill (eds.) Raven Press, New York, 189-317
2. Mortimer D1, Mortimer ST. Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Methods Mol Biol.* 2013;927:77-87.
3. Lu JC et al., Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia.* 2014

- May;46(4):329-38.
4. Mortimer ST, van der Horst G, Mortimer D. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian J Androl*. 2015 Jul-Aug;17(4):545-53.
 5. S.P. Boyers, R.O. Davis, D.F. Katz. Automated semen analysis *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil*, 12 (1989), pp. 167–200
 6. R.P. Amann, D.F. Katz. Reflections on CASA after 25 years *J Androl*, 25 (2004), pp. 317–325
 7. R.P. Amann, R.H. Hammersted. Validation of a system for computerized measurement of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol Reprod*, 23 (1980), pp. 647–656
 8. J.F. Moruzzi, A.J. Wyrobek, B.H. Mayall, B.L. Gledhill Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis *Fertil Steril*, 50 (1988), pp. 142–162
 9. R.P. Amann, R.H. Hammerstedt. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*, 14 (1993), pp. 397–406
 10. M.L. Broekhuijse, E. Šoštarič, H. Feitsma, B.M. Gadella. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology*, 76 (2011), pp. 1473–1486
 11. B. Bartoov, D. Klay, A. Mayevsky. Sperm motility analyzer (SMA), a practical tool of motility and cell concentration determinations in artificial insemination centers. *Theriogenology*, 15 (1981), pp. 173–182
 12. S.D. Olson, S.S. Suarez, L.J. Fauci. Coupling biochemistry and hydrodynamics captures hyperactivated sperm motility in a simple flagellar model. *J Theoretical Biol*, 283 (2011), pp. 203–216
 13. M.J. Tomlinson, K. Pooley, T. Simpson, T. Newton, J. Hopkisson, K. Jayaprakasan, et al. Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multi-tracking algorithms *Fertil Steril*, 93 (2010), pp. 1911–1920
 14. W.V. Holt, J. O'Brien, T. Abaigar. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reprod Fertil Dev*, 19 (2007), pp. 709–718

15. F. Martínez-Pastor, E.J. Tizado, J.J. Garde, L. Anel, P. de Paz. Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, 75 (2011), pp. 783–795
16. Brito L, Beckman B, Cardwell B, DeJarnette JM, Hutchens L, Kaya A, et al. NAAB-CSS semen quality control program minimum guidelines. *Proceedings of the 24th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction 2012*;37–41.
17. C. Schleh, A.L. Leoni. How to optimize the benefits of computer-assisted sperm analysis in experimental toxicology. *J Occup Med Toxicol*, 8 (2013), p. 6
18. J. Versteegen, M. Iguer-Ouada, K. Onclin. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57 (2002), pp. 149–179
19. ESHRE Andrology Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum Reprod*, 13 (1998), pp. 142–145
20. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. World Health Organization (Fifth edition), Geneva (2010), pp. 179–202
21. Lu JC, Huang YF, Lü NQ. Computer-aided sperm analysis: past, present, future [e-pub ahead of print]. *Andrologia*, published online 1 April 2013.
22. G. Corkidi, B. Taboada, C.D. Wood, A. Guerro, A. Darszon. Tracking sperm in three-dimensions. *Biochem Biophys Res Commun*, 373 (2008), pp. 125–129
23. J. Ehlers, M. Behr, H. Bollwein, M. Beyerbach, D. Waberski. Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. *Theriogenology*, 76 (2011), pp. 448–454
24. C. Hansen, T. Vermeiden, J.P. Vermeiden, C. Simmet, B.C. Day, H. Feitsma. Comparison of FACSCount AF system, improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology*, 66 (2006), pp. 2188–2194