



# Università degli Studi di Bari Aldo Moro

Anno Accademico 2019/20

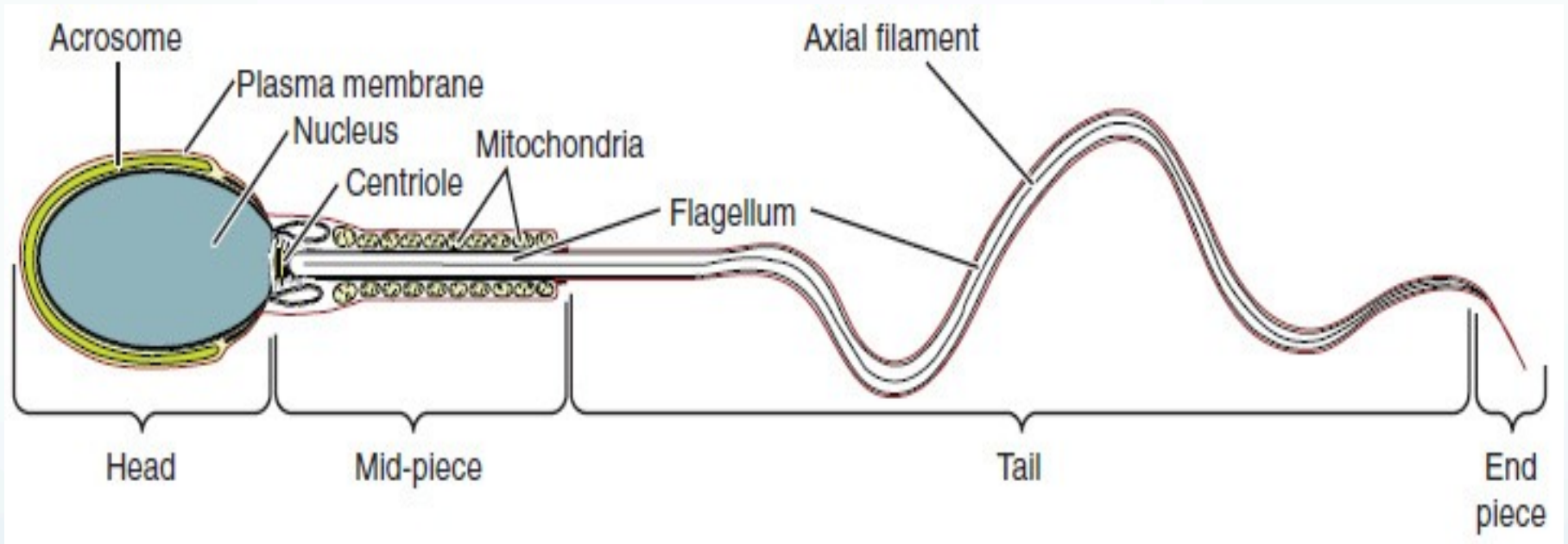
## Scuola di Specializzazione in “Fisiopatologia della Riproduzione degli Animali Domestici”

### **Sperm quality assessment**

**Prof.ssa M.E. Dell'Aquila**

**Dept. Bioscienze Biotecnologie e Biofarmaceutica -  
UNIBA**

# Struttura dello spermatozoo maturo



# Sperm quality assessment

## ■ **Macroscopic**

- Color
- Volume
- pH
- Consistency

## ■ **Microscopic**

- Concentration (hemocytometer, automatic counters)
- Viability (eosin/nigrosin; eosin/bromophenol blue; Hoechst 33258)
- Motility (mass, individual)
- Morphology (sperm abnormalities)
- Pathological cells

## ■ **Specific lab tests**

- Hygienic quality
- Metabolic activity
- Antioxidant capacity (catalase, SOD, GPX,...)

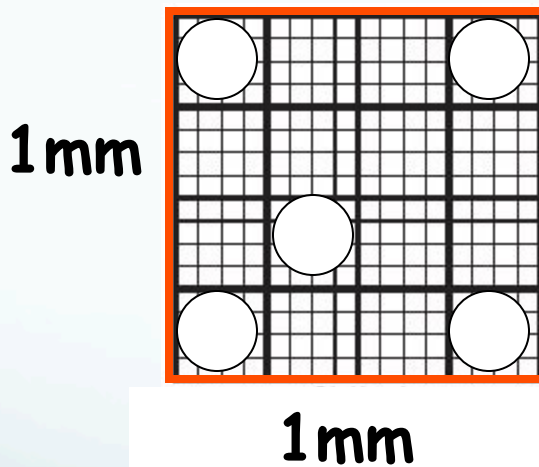
# Volume dell'eiaculato

<b>Specie</b>	<b>Volume</b>
<b>Toro</b>	<b>0.5-12 ml</b>
<b>Stallone</b>	<b>20-150 ml</b>
<b>Cane</b>	<b>1- 40 ml</b>
<b>Gatto</b>	<b>40 ml</b>
<b>Ariete</b>	<b>1 ml</b>
<b>Becco</b>	<b>0.8-2 ml</b>
<b>Verro</b>	<b>100-225 ml</b>
<b>Uomo</b>	<b>0.5-5 ml</b>

# Valutazione della concentrazione nemaspermatica (N° spermatozoi/ml)

Uso della camera contaglobuli

## Camera di Thoma



Profondità: 0.1 mm;  
Volume: 0.1 mm<sup>3</sup>

Fattori di conversione della camera = 50.000 (per conta di 5 celle)  
10.000 (per conta di tutte le 16 celle)

Fattore di diluizione del seme (es: 100)



Concentrazione = N° spermatozoi contati  $\times 10^4 \times 10^2$

# Concentrazione nemaspermatica media

<b>Specie</b>	<b>Concentrazione</b>
<b>Toro</b>	<b>0.8-1.2 x 10<sup>9</sup>/ml</b>
<b>Stallone</b>	<b>150 x 10<sup>6</sup>/ml</b>
<b>Cane</b>	<b>300 x 10<sup>6</sup>/ml</b>
<b>Gatto</b>	<b>1.7 x 10<sup>9</sup>/ml</b>
<b>Ariete</b>	<b>3 x 10<sup>9</sup>/ml</b>
<b>Becco</b>	<b>2-4 x 10<sup>9</sup>/ml</b>
<b>Verro</b>	<b>200 x 10<sup>6</sup>/ml</b>
<b>Uomo</b>	<b>60-100 x 10<sup>6</sup>/ml</b>

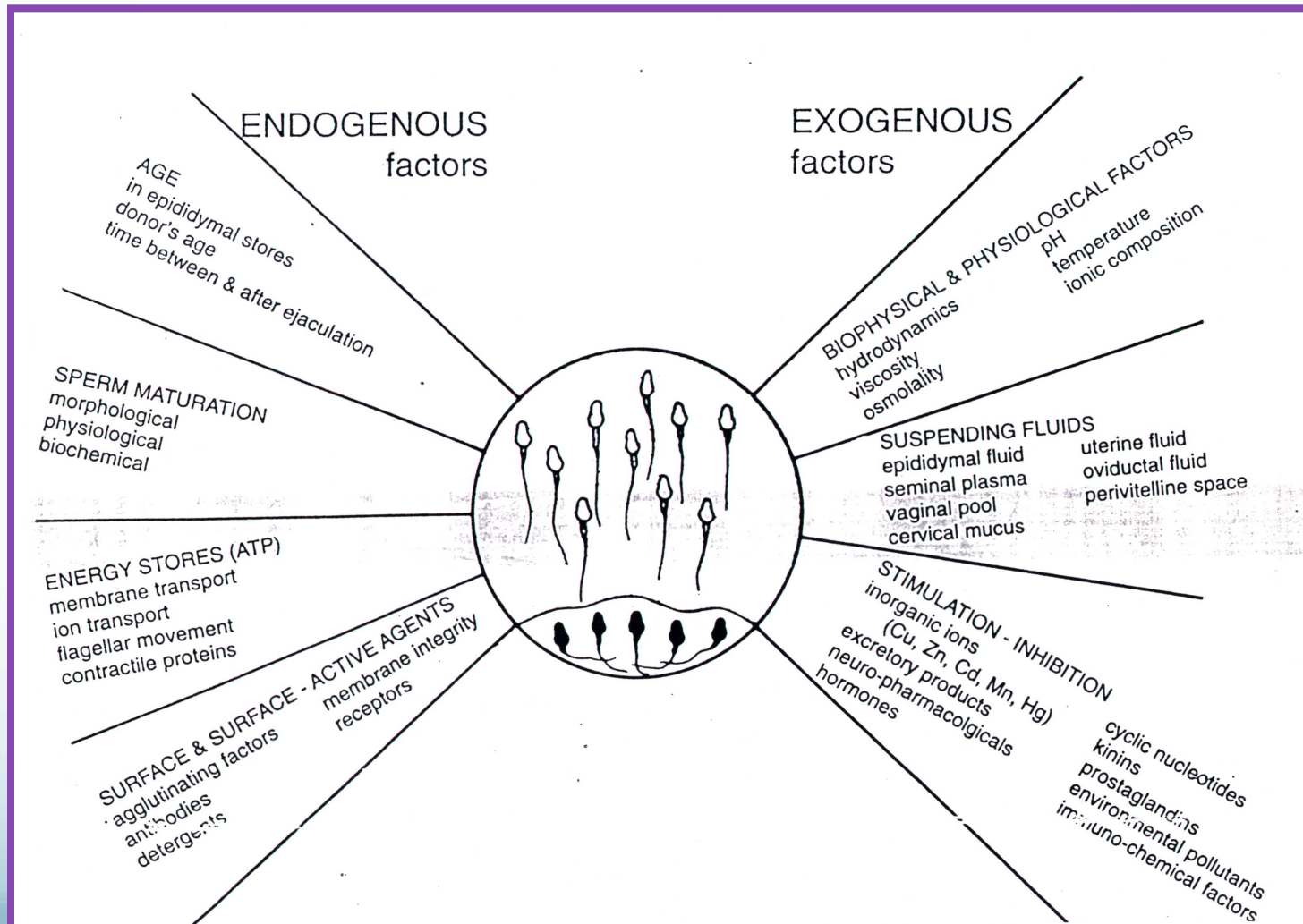
# Valutazione della motilità

Valutazione visiva  
(soggettiva) in microscopia  
in campo chiaro

Per il laboratorio di IVF un  
operatore con esperienza  
effettuare la valutazione  
della percentuale di  
spermatozoi mobili



# Fattori endogeni ed esogeni che influenzano la motilità spermatica



Da Hafez et al., 2000



# Determinazione dello score del movimento di massa

- **0** total immobility
- **1** individual movement
- **2** very slow movement
- **3** general wave movement, slow amplitude of waves
- **4** rapid wave motion, no eddies
- **5** rapid wave motion, eddies present

# Valutazione della vitalità del seme

Integrità della membrana plasmatica

## Metodo:

coloranti: - eosina/nigrosina  
- eosina/blu di bromofenolo

Seme + coloranti, striscio, osservazione in  
microscopia ad interferenza o contrasto di  
fase (spz. bianchi= vivi, spz. rossi/blu=morti)

# Protocollo sperimentale per seme bovino

- Eosina (2% in tampone fosfato di  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$   
(80.4 ml 125mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 19.6 ml 125mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Blu di bromofenolo (0.2g BB+0.4g  $\text{Na}^+$  citrato in  
10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  distillata)
- Nigrosina (10% in  $\text{H}_2\text{O}$  distillata)

Mescolare 1 goccia di seme, 2 gocce di BB e 4 gocce di N (lasciare incubare per 10"-15").  
Striscio e osservazione.

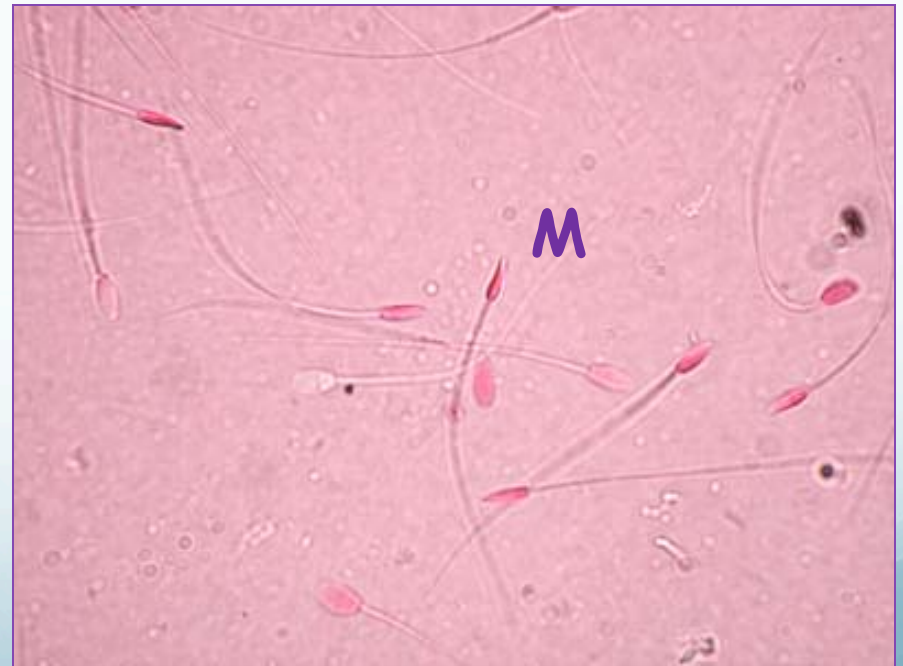
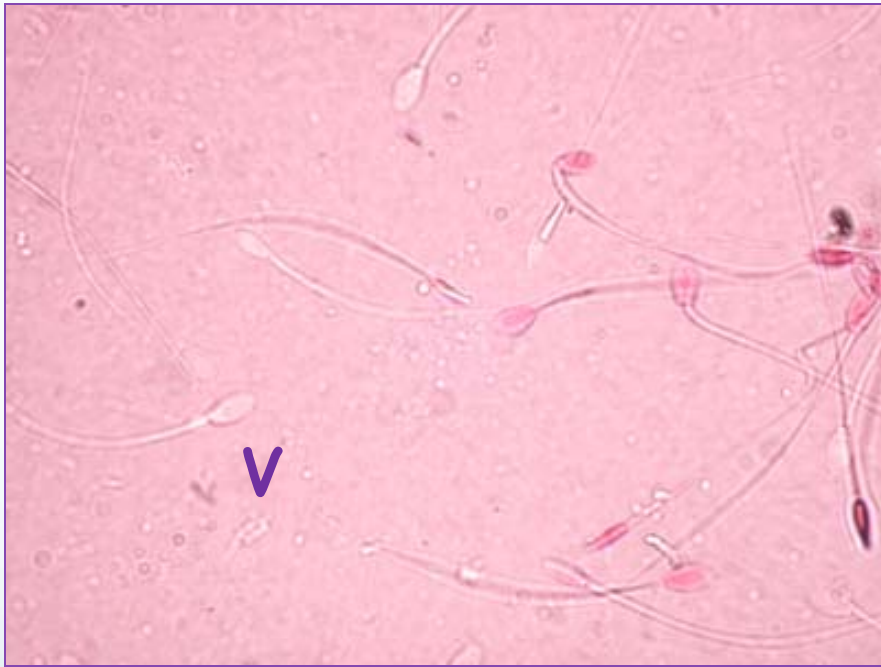
NB: E e BB sono usati in alternativa

# Protocollo sperimentale per seme umano

- Preparare una soluzione 0.67% eosina, 10% nigrosina in 0.9% NaCl. (al buio a 4°C)
- Mescolare seme e colorante 1:1 (50µl+50µl)
- Incubare 30" a temperatura ambiente
- Trasferire goccia da 10 µl su vetrino portaoggetti (2 smears per campione)
- Lasciare asciugare all'aria
- Esaminare in microscopia in campo chiaro (1000x) con olio ad immersione
- Spz bianchi = vivi; Spz **rosa** = morti

Bjorndahl et al., Hum Reprod 2003,18:813-816

# Colorazione Eosina/Nigrosina

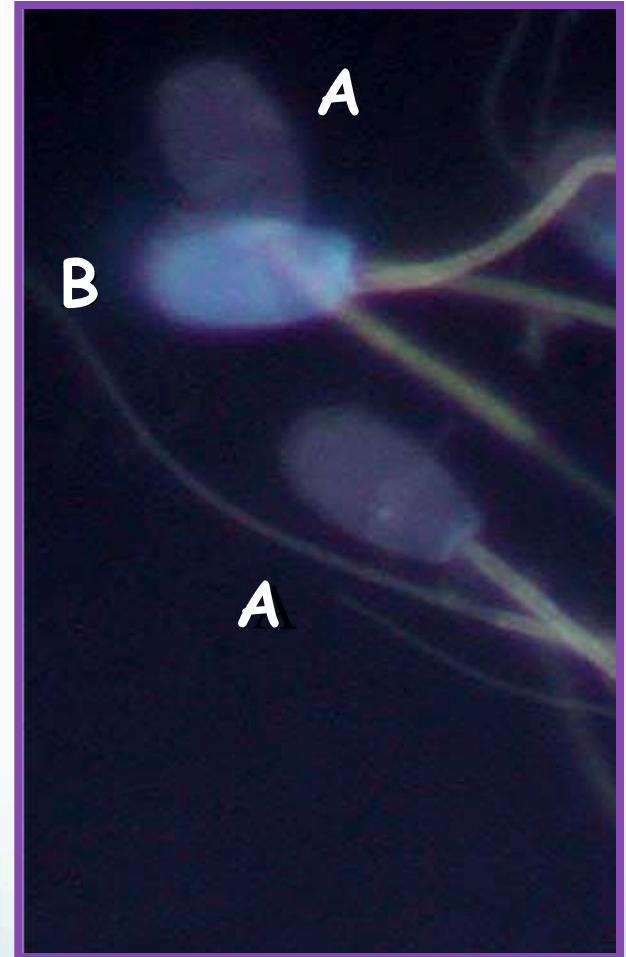


# Valutazione della vitalità con colorante fluorescente HOECHST 33258

- COLORANTE SOPRAVITALE FLUORESCENTE NON INTERCALANTE CON SPECIFICITA' PER ADENINA E TIMINA .
- EMETTE LUCE DI COLORE CELESTE/BLU A 420 nm SE COLPITO DA LUCE CON LUNGHEZZA D'ONDA 330-380 nm.
- PERMETTE DI EVIDENZIARE SPERMATOZOI VIVI (A) OPPURE MORTI (B), IN BASE ALL' INTEGRITA' DELLA MEMBRANA E QUINDI ALLA CAPACITA' O MENO DI POTER PENETRARE NELLA CELLULA

## PROTOCOLLO SPERIMENTALE

- Aggiungere 0.5  $\mu$ l di soluzione Hoechst 33258 (10  $\mu$ g/ml) a 50  $\mu$ l di seme
- Incubare per 2'; aggiungere 500  $\mu$ l di PVP al 2% (w/v) e centrifugare a 900 x g per 5'.
- Rimuovere il sovrnatante e risospendere il pellet in 45  $\mu$ l di TALP, quindi osservare in microscopia a fluorescenza con lampada UV e filtro di eccitazione a 365 nm.



Albrizio et al. Reproduction 2004

# Caratteristiche e composizione chimica del seme di animali domestici

CHARACTERISTIC OF COMPONENT	BULL	RAM	BOAR	STALLION	COCK <sup>a</sup>
Ejaculate volume (ml)	5-8	0.8-1.2	150-200	60-100	0.2-0.5
Sperm concentration (million/ml)	800-2000	2000-3000	200-300	150-300	3000-7000
Sperm/ejaculate (billion)	5-15	1.6-3.6	30-60	5-15	0.06-3.5
Motile sperm (%)	40-75	60-80	50-80	40-75	60-80
Morphologically normal sperm (%)	65-95	80-95	70-90	60-90	85-90
Protein (g/100 ml)	6.8	5.0	3.7	1.0	1.8-2.8
pH	6.4-7.8	5.9-7.3	7.3-7.8	7.2-7.8	7.2-7.6
Fructose	460-600	250	9	2	4
Sorbitol	10-140	26-170	6-18	20-60	0-10
Citric acid	620-806	110-260	173	8-53	nil
Inositol	25-46	7-14	380-630	20-47	16-20
Glyceryl phosphoryl choline (GPC)	100-500	1100-2100	110-240	40-100	0-40
Ergothioneine	0	0	17	40-110	0-2
Sodium	225 ± 13	178 ± 11	587	257	352
Potassium	155 ± 6	89 ± 4	197	103	61
Calcium	40 ± 2	6 ± 2	6	26	10
Magnesium	8 ± 0.3	6 ± 0.8	5-14	9	14
Chloride	174-320	86	260-430	448	147

Adapted from Lake. In: Bell, Freeman, eds. *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. New York: Academic Press, 1971; and from Foote, Gilbert, White. In: Hafez ESE, ed. *Reproduction in Farm Animals*. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1980.

<sup>a</sup>Mean values of chemical components (mg/100 ml ± S.E.) unless otherwise indicated.

# Analisi computerizzate



**ESEMPIO:** Sperm CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer) System IVOS, Hamilton Research Inc.



# Analisi computerizzata della motilità

Videomicrografia con analisi d'immagine

Valutazione di:

- motilità totale (%)
- motilità progressiva (%)
- Velocità (media, lineare e curvilinea)
- Ampiezza dello spostamento laterale della testa
- Iperattivazione

# Parametri spermatici valutati con CASA-IVOS

## SPECIMEN INFORMATION

Volume	4.4	Sample:Diluent	1:11.0
Req. Total Conc.	1	Req. Prog. Conc.	1
Straw Volume	0.25		
Operatør			
Forsøg			
TALP lab. no.			
Strå dato			
Tyr navn			
Kammer			
Bestemmelse nr.			

## COUNT SUMMARY

Category	Cells Counted	Sample (M)	Concentration (M/ml)	Percent
Total	179	397.1	90.2	100
Motile	53	117.6	26.7	30
Progressive	13	28.8	6.6	7

## BULL RESULTS

Parameter	Value	Units
Total Sperm/Straw	0.3	M
Dilute Ejaculate to	397.1	ml
Progressive Sperm/Straw	0.3	M
Dilute Ejaculate to	28.8	ml

# Parametri spermatici di velocità valutati Con CASA-IVOS

VCL = Curvilinear velocity ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )

VSL = Straight-line velocity ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )

VAP = Average path velocity ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )

ALH = amplitude of lateral head displacement ( $\mu\text{m}$ )

LIN = linearity  $VSL/VCL$

STR = straightness =  $VSL/VAP$

BCF = beat cross frequency (Hz)

Vedi Fig.3.3 Manuale WHO del 2010

# Analisi citofluorimetriche

FACSscan



BD FACS ARIA



BD FACS Vantage SE  
Flow cytometer



Da Becton Dickinson web site

# Valutazione dell'integrità della membrana plasmatica (CFDA+PI)

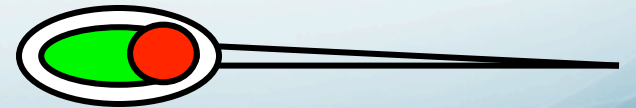
**CFDA** (carbossifluoresceina diacetato) = permea immediatamente le membrane cellulari quando ancora non è fluorescente. L'idrolisi di legami di estere risulta nella formazione di un **fluoroforo verde** che è altamente fluorescente e non essendo permeabile alle membrane resta intrappolato all'interno di cellule che hanno membrana integra.

**PI** (ioduro di propidio) = è un fluoroforo rosso luminoso, specifico per gli acidi nucleici relativamente impermeabile alle membrane e non colora nuclei di spermatozoi vitali.

A) solo nucleo fluorescente rosso = spermatozoi **morti**



B) acrosoma integro e tratti rotti della membrana plasmatica in zona post-acrosomiale = spermatozoi **agonici**



C) membrana che non lascia più passare CFDA = spermatozoi **vitali**



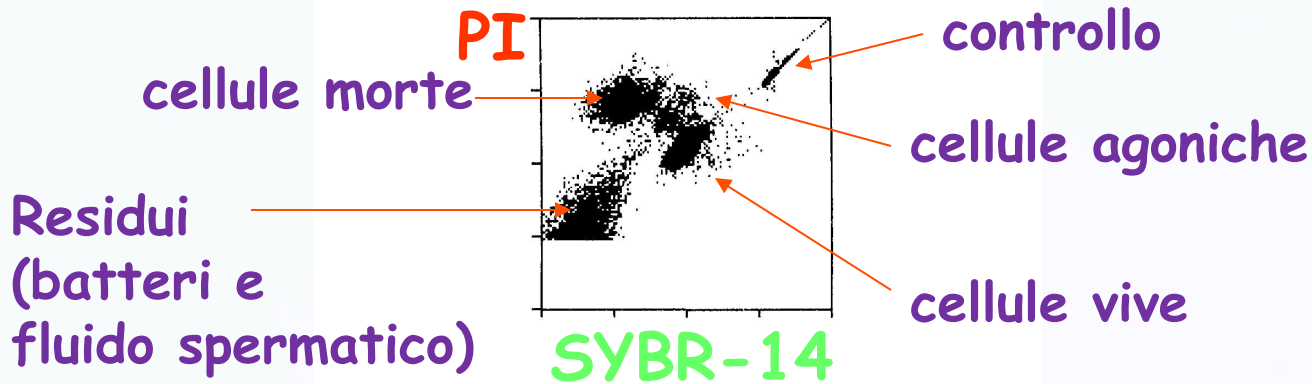
# Protocollo sperimentale

- Scongellare 2 paillettes per ogni campione di seme (30" a 37°C)
- Versare il contenuto in eppendorfs
- Diluire 1:20 (950µl PBS+50µl seme)
- Preparare test tube con Sybr-14/PI

(brevetti Molecular Probes o BD)

- Aggiungere 50 µl di seme diluito
- 5' al buio
- Porre la provetta nel citofluorimetro
- Attendere uscita del foglio report

Garner e Johnson, 1995 Biol Reprod 53:276-284.



-----  
BD Sperm Count Report

Site Name: BDIS

Date: 06/26/03

Time: 11:46:54

Sample ID: 2

Comment: -----

Concentration - Sperm/ml

Viabile: 0.033 × 10<sup>9</sup> = 33 × 10<sup>6</sup>

Total : 0.126 × 10<sup>9</sup> = 126 × 10<sup>6</sup>

Viability: 26.5%

Semen Volume (ml): 5.0

No. of Doses (Using Total Sperm): 0

Diluent Required (ml): -2

Volume After Dilution (ml): 3

Sperm/Dose: 1500.0 × 10<sup>6</sup>

Reagent Lot: 54225

File Information

Events: 14999

Time : 16.000000

# Becton Dickinson Sperm Count Report

# Valutazione dello stato della cromatina nucleare (FCM-SCSA)

- Il test **SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay)** è un test citofluorimetrico (**FCM**) che misura la suscettibilità del DNA spermatico alla denaturazione in situ.
- Il test fornisce un'analisi oggettiva della **INTEGRITÀ DELLA CROMATINA NUCLEARE** in un campione di seme identificando rapidamente la frazione di cellule che mostrano danneggiamento del DNA dovuto a **rottura delle strands** o incrementata intensità di colorazione dovuta ad **alterato rapporto tra DNA e PROTAMINE**
- I parametri SCSA sono in genere strettamente correlati con i parametri usati routinariamente per l'analisi del seme.
- Bassa variabilità intra/inter saggio
- Fornisce misurazione indipendente e complementare della qualità spermatica (funzione testicolare e delle ghiandole accessorie)



# Protocollo sperimentale

- Preparare una sospensione cellulare ( $1-2 \times 10^6$  cells/ml)
- Trattare con soluzione detergente (0.1% Triton X-100, 0.15 mol/l NaCl e 0.08 N HCl) per 30''
- Colorare con Arancio di acridina (6 mg/l in tampone fosfato-citrato; pH6)
- Analisi con FACS Sort flow cytometer
- Valutazione del DFI= DNA Fragmentation Index
- Il DFI ha diverse sottocategorie, identificative del grado di frammentazione/ cellula e della % di cellule con DNA frammentato

# Valutazione della frazione di spermatozoi in apoptosi (microscopica; citofluorimetrica)

## Valutazione microscopica

- 50 ml di sospensione spermatica
- Striscio su vetrini sialinizzati
- Fissaggio con metanolo/acido acetico (3/1) per 20'
- Permeabilizzazione con 1% Triton X100 in PBS

### KIT per TUNEL Technique

- Incubazione con TdT a 37°C per 1h
- Legame con digossigenina
- Incubazione con anticorpo antidigossigenina coniugato con perossidasi (30' al buio)
- Rivelare la perossidasi con DAB (diaminobenzidina)

Benchaib et al., 2003 Hum Reprod 18:1023-1028

# **ANOMALIE SPERMATICHE IN BASE SUL SITO DEL TRATTO GENITALE IN CUI SI SONO ORIGINATE**

**Primarie:** si originano durante la spermatogenesi  
(testa e tratto intermedio)

**Secondarie:** si originano all' interno dell' epididimo  
(es: gocce protoplasmatiche)

**Terziarie:** si originano dopo l' eiaculazione  
anche a causa di inadeguate manipolazioni  
(es: code ad occhiello)

# **CLASSIFICAZIONE DELLE ANOMALIE IN RELAZIONE AGLI EFFETTI SULLA CAPACITA' FECONDANTE**

- **Maggiori:**

- **Testa**

- **Acrosoma**

- **Gocce protoplasmatiche**

- **Minori (es: teste distaccate)**

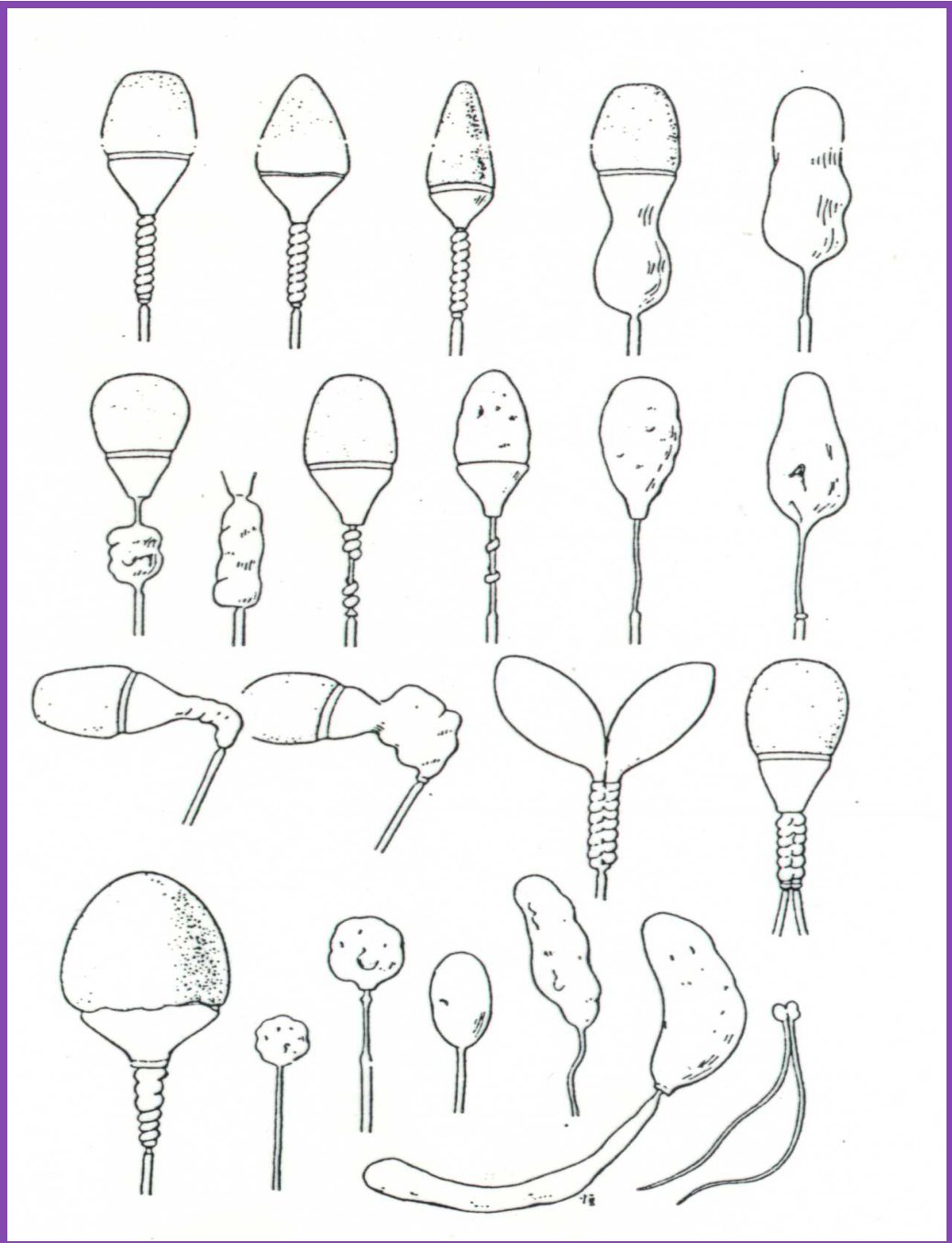
# Analisi della morfologia spermatica

- Anomalie morfologiche  
(testa, maturità testicolare)  
(coda, maturità epididimale)

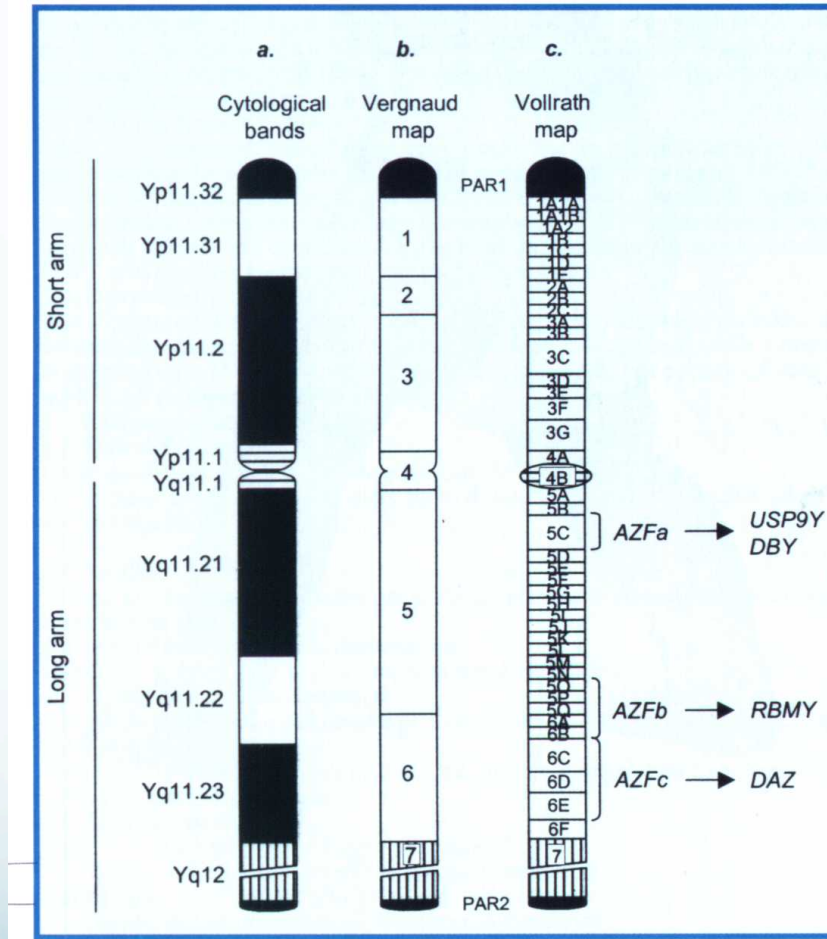
**Metodo:** soluzione fisiologica/semine 3:1 (v/v), striscio, **rosa bengala** 10-15', osservazione in microscopia ad interferenza o contrasto di fase.

**RB**=3 g in 99 ml H<sub>2</sub>O e 1 ml formalina al 40%

**Principali  
anomalie  
morfologiche  
riscontrabili  
in  
spermatozoi  
di mammifero**

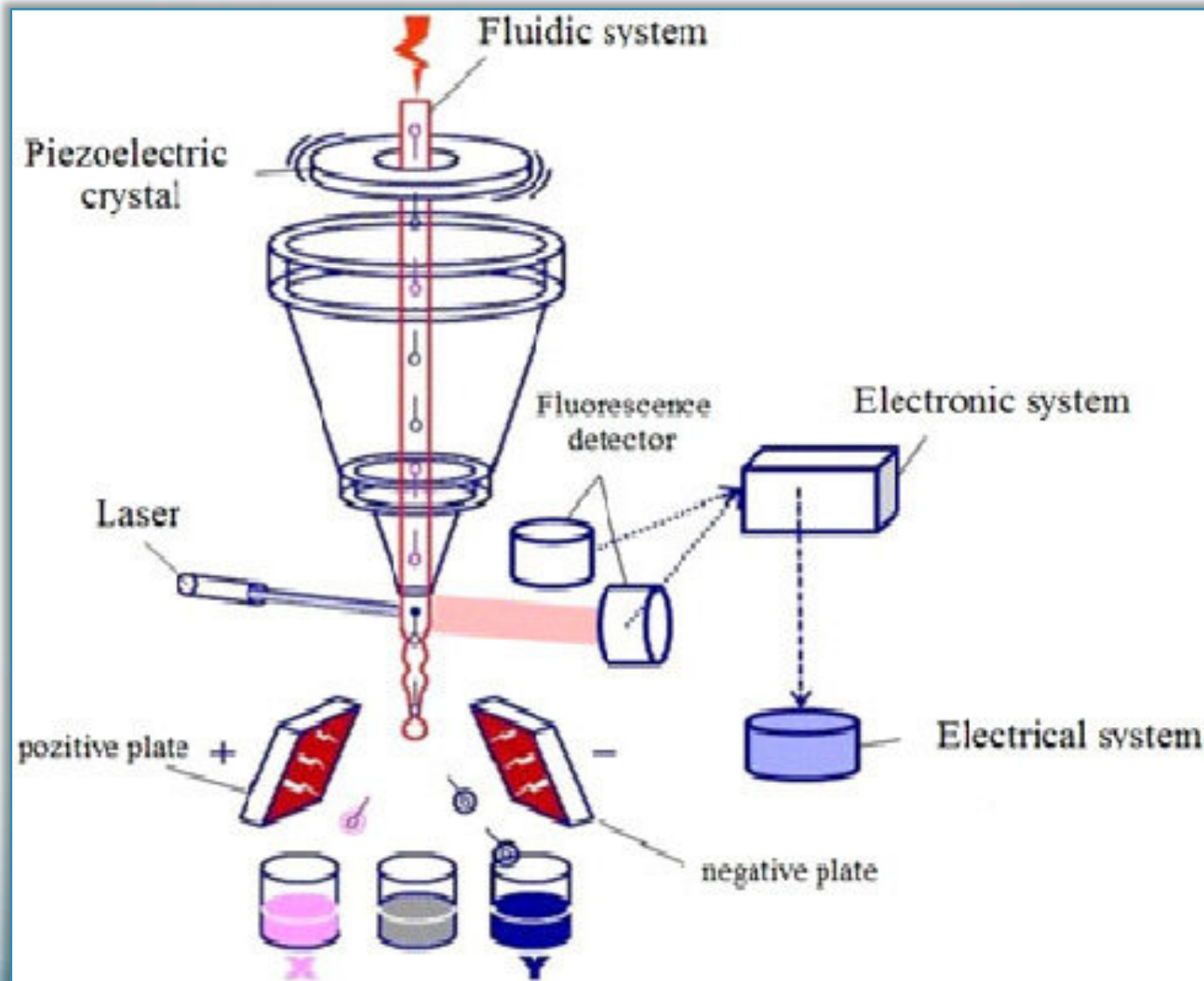


# Cause genetiche delle anomalie della spermatogenesi



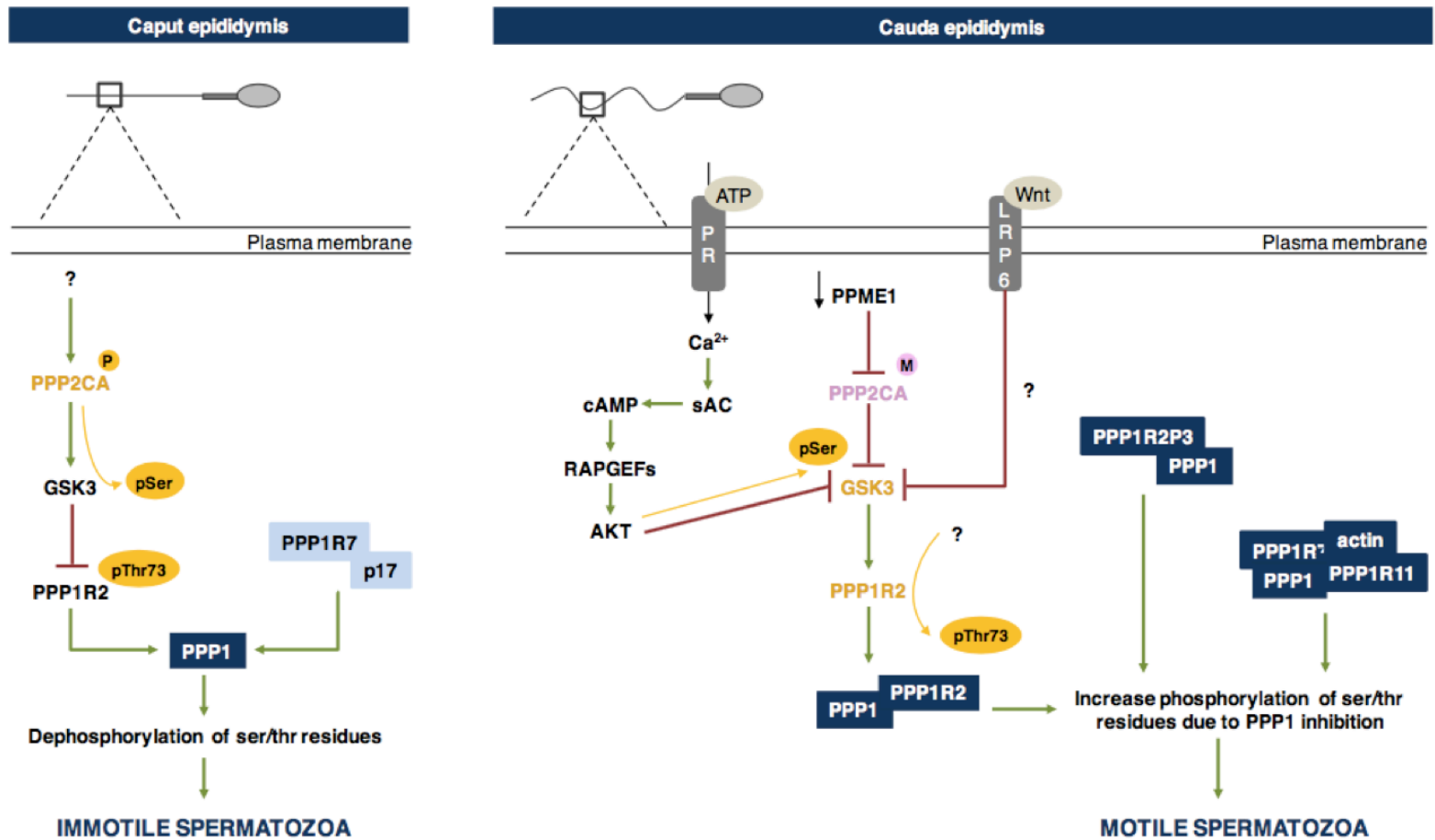
Foresta et al., 2000 Repronews 2, 3-12.

# X- and Y-bearing sperm sorting

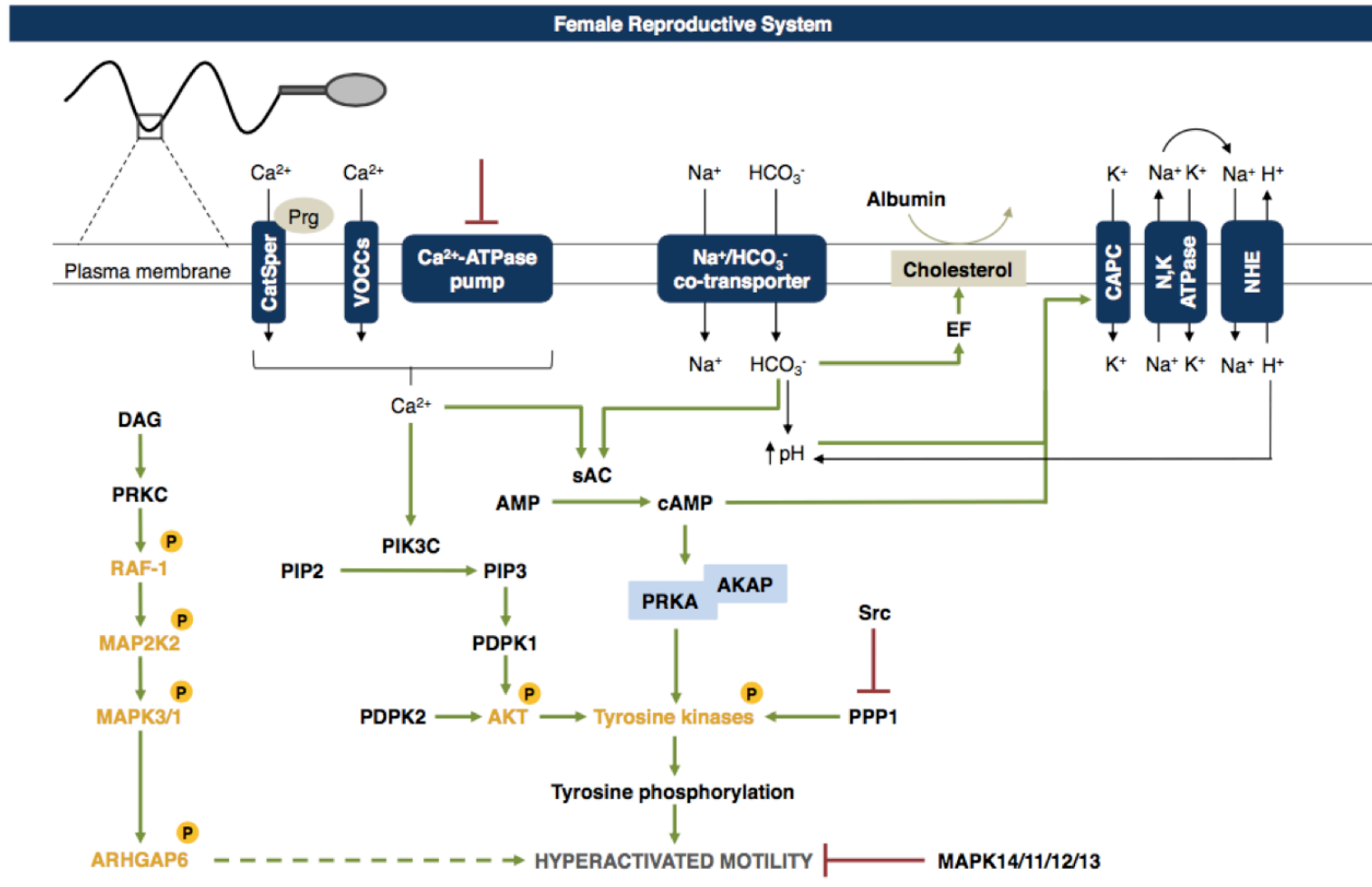




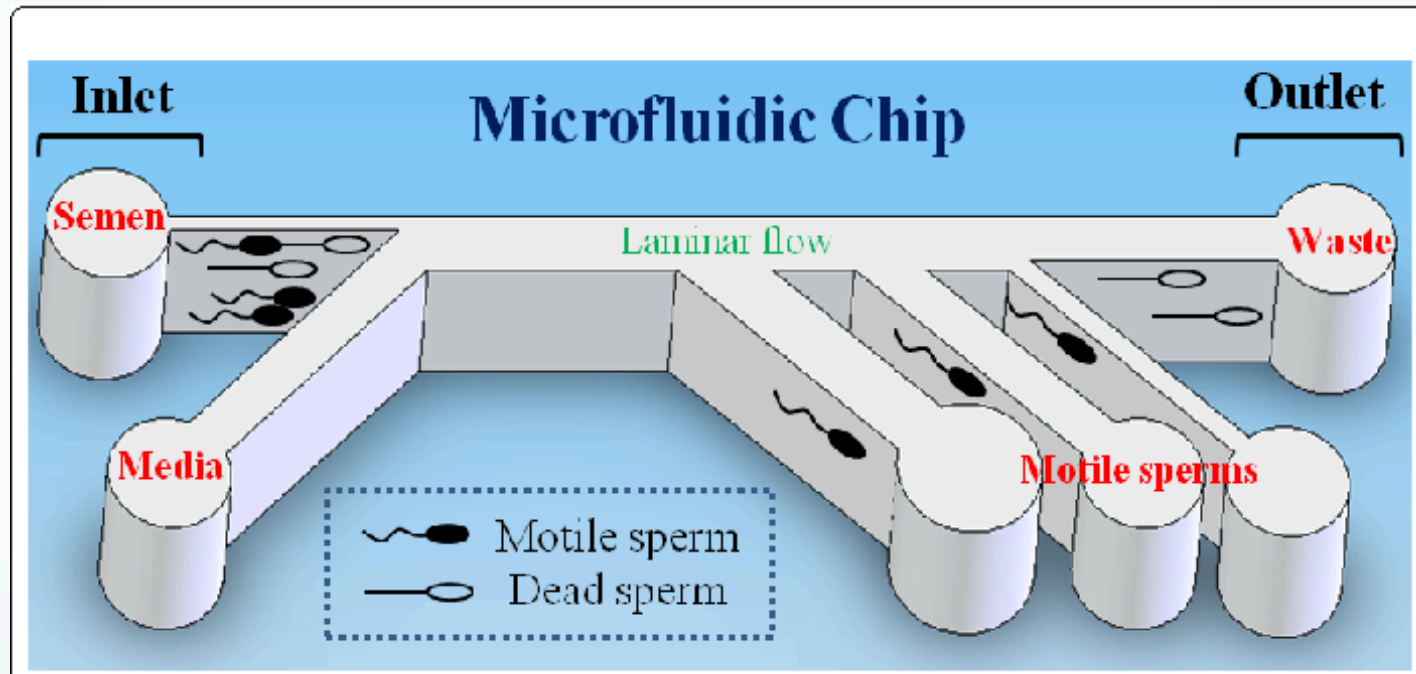
# Sperm motility acquisition in the epididymis (da Freitas et al., 2017)



# Hyperactivated sperm motility (da Freitas et al., 2017)



# Motile sperm sorting by microfluidic lab-on-chip technology



Huang et al., 2014

# Lettere consigliate

- Appunti di lezione
- Articoli:
  - Bjorndahl et al., 2003 Hum Reprod 18:813-816 (Test Eosina/Nigrosina)
  - Garner & Johnson, 1995 Biol Reprod 53: 276-284 (Test Sybr 14/PI)
  - Richthoff et al., 2002 Hum Reprod 17:3162-3169 (Test FC SCSA)
  - Benchaib et al., 2003 Hum Reprod 18:1023-1028 (APOPTOSI)
  - Foresta et al., 2000 Repronews 2, 3-12. (delezioni cromosoma Y)
  - Nostri articoli val qual seme Equini/Bufalini (Dell'Aquila ME)