



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA**

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Veterinarie,  
*curriculum Riproduzione, Patologia, Allevamento e Benessere animale*  
XXXI Ciclo

***Metodologie innovative per la crioconservazione del  
germoplasma nella specie ovina***

***Tutor: Prof. Sergio Ledda***

***Dottorando: Dott. Stefano Mario Nieddu***

*Anno Accademico 2017/2018*

# INDICE

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1	Crioconservazione	3
1.1.1	Crioprotettori	5
1.2	Tecniche di Crioconservazione	8
1.2.1	Congelamento	8
1.2.2	Effetti del congelamento	10
1.3	Vitrificazione	12
1.3.1	Dispositivi per la Vitrificazione	14
1.4	Liofilizzazione o Freeze Drying	16
<b>2</b>	<b>Scopo della tesi</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Esperimento 1: Applicazione della tecnica del Partial Freeze-Drying al congelamento del seme di ariete (High post-thaw serviva of ram sperm after partial freeze-drying) Published on line 14 March 2018 Journal of Assisted Reproduction and Genetics.</b>	<b>19</b>
3.1	Introduzione	19
3.2	Materiali e metodi	21
3.2.1	Preparazione del materiale seminale	21
3.2.2	Congelamento e scongelamento del seme	23
3.2.3	Freeze-drying	24
3.2.4	Volume e peso	25
3.3	Analisi statistica	25
3.4	Risultati	25
3.4.1	Motilità dopo congelamento e scongelamento del seme	25
3.4.2	Freeze-drying	27
3.5	Discussione	29

<b>4</b>	<b>Esperimento 2: Vittrificazione di tessuto testicolare di ovino prepubere con l'utilizzo del micro-device "E.Vit"</b>	<b>33</b>
4.1	Introduzione	34
4.2	Scopo	38
4.3	Materiali e metodi	39
4.3.1	Disegno sperimentale	39
4.3.2	Raccolta e preparazione dei campioni	39
4.3.3	Vittrificazione e ripristino della temperatura	40
4.3.4	Coltura in vitro	42
4.3.5	Valutazione della vitalità cellulare	43
4.3.6	Isolamento dell'RNA e trascrizione inversa	43
4.3.7	Real time-polymerase chain reaction	44
4.4	Analisi statistica	47
4.5	Risultati	47
4.5.1	Vitalità cellulare	47
4.5.2	Espressione genica	48
4.6	Discussione	50
<b>5</b>	<b>Esperimento 3: Applicazione di nuove metodiche per la vittrificazione degli embrioni di ovino</b>	<b>54</b>
5.1	Introduzione	54
5.2	Disegno sperimentale	57
5.3	Materiali e metodi	58
5.3.1	Recupero oociti	58
5.3.2	Maturazione (IVM), fertilizzazione (IVF) e coltura degli embrioni in vitro (IVC)	59
5.3.3	Vittrificazione embrioni	61
5.3.4	Sistema dinamico	63
5.3.5	Sistema 2 step	63
5.3.6	Ripristino della temperatura	64

5.3.7	Analisi dell' apoptosi attraverso l'utilizzo della tecnica TUNEL e microscopio confocale	64
5.4	Analisi statistica	66
5.5	Risultati	67
5.5.1	Recupero embrioni	67
5.5.2	Riespansione dopo 2 ore	67
5.5.3	Sopravvivenza delle blastocisti dopo 24h di coltura <i>in vitro</i>	68
5.5.4	Competenza allo sviluppo dopo 48h di coltura <i>in vitro</i>	70
5.5.5	Frammentazione del DNA e analisi TUNEL	71
5.6	Discussione	77
<b>6</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>86</b>

# 1 INTRODUZIONE

La conservazione di campioni biologici a basse temperature prende il nome di crioconservazione. Sotto questa definizione generale sono comprese un insieme di tecniche volte a preservare per lunghi periodi di tempo la morfologia, la vitalità, l'integrità del patrimonio genetico e la funzionalità di cellule, tessuti e organi. Il mezzo d'elezione impiegato per lo stoccaggio dei campioni da crioconservare è l'azoto liquido. A temperature criogeniche infatti il metabolismo cellulare si riduce drasticamente fino all'arresto delle principali reazioni enzimatiche e chimiche. Numerosi sono i campi di utilizzo della crioconservazione del materiale biologico. In ambito riproduttivo la conservazione a lungo termine di materiale seminale, oociti ed embrioni si affianca all'applicazione delle tecniche di riproduzione assistita fornendo un utile supporto nel superamento dei problemi di infertilità sia maschile che femminile. Anche i tessuti possono essere crioconservati. Negli ultimi trent'anni sono stati fatti enormi passi avanti nel campo della crioconservazione del germoplasma, sia in campo umano che sul modello animale. L'insieme di queste tecniche infatti è una risorsa fondamentale in campo animale per una serie di importanti motivi. Permette infatti di avere a disposizione una fonte di materiale da poter utilizzare in ambito zootecnico per il miglioramento delle razze animali da produzione. Basti pensare agli enormi miglioramenti che sono stati portati avanti negli ultimi anni su razze da carne, latte, lana. Inoltre il germoplasma maschile crioconservato può essere facilmente trasportato in paesi diversi da quello del centro di raccolta, superando tutti i problemi sanitari e di benessere animale legati alla movimentazione di animali vivi. Nello stesso tempo la creazione di banche di germoplasma permette di

poter salvaguardare alcune specie o razze di animali che per svariati motivi possono essere in pericolo di estinzione o ibridazione. Nell'ambito dei programmi di ripopolamento o di salvaguardia di alcune popolazioni animali la crioconservazione rappresenta infatti un'arma efficacissima per il mantenimento del patrimonio genetico.

In campo umano la conservazione del materiale seminale, oociti o embrioni rappresenta una delle sfide più impegnative degli ultimi anni. Per quanto riguarda la parte maschile, già da tempo esiste la possibilità di poter congelare il materiale seminale, una scelta molto importante per esempio nei pazienti che si dovranno sottoporre a cicli di radio/chemioterapia e volessero preservare per il futuro la possibilità di concepire. Inoltre, in campo umano sono sempre più le forme tumorali che sono diventate curabili grazie allo sviluppo di nuove terapie e dunque anche l'attesa di vita successiva a trattamenti chemioterapici è molto aumentata negli ultimi anni.

Proprio l'innalzamento della media di vita anche nei giovani pazienti ha portato alla necessità di concentrare l'attenzione sugli effetti che le terapie radio-chemioterapiche possono avere sulla qualità di vita del paziente, e in particolare sulle problematiche legate all'infertilità. Come da tempo è noto infatti, tali procedure possono danneggiare le gonadi maschili e femminili.

Da qui l'obiettivo di concentrare gli sforzi su metodologie innovative che possano garantire una conservazione duratura del germoplasma.

In ambito femminile tali biotecnologie di avanguardia sono rivolte alle pazienti che devono essere sottoposte a trattamenti chirurgici, terapie farmacologiche, chemio e/o radioterapie, che possano

compromettere irrimediabilmente la funzionalità ovarica. Molto spesso, per motivi clinici così come nel caso di età prepubere, tali categorie di pazienti non possono essere sottoposte a stimolazione della crescita follicolare multipla e prelievo chirurgico degli ovociti, per cui non è possibile criopreservare questi ultimi per ripristinare la potenzialità riproduttiva dopo remissione della patologia. La necessità di sviluppare tecnologie efficienti per congelamento di tessuto ovarico è diventata sempre più impellente grazie alle nuove strategie antitumorali che hanno di gran lunga aumentato le percentuali di sopravvivenza media delle bambine e delle giovani donne affette da neoplasie quali leucemie, sarcomi, linfomi, tumori alla mammella, ponendo l'attenzione della comunità scientifica sugli effetti a lungo termine delle terapie oncosoppressive e sulla qualità della vita del paziente.

Ad esempio la possibilità di crioconservare il tessuto ovarico permette di preservare la fertilità in bambine o donne affette da neoplasie e/o in procinto di affrontare cure chemioterapiche (Donnez et al., 2011). Altresì, la possibilità di crioconservare gli oociti è una valida alternativa al congelamento degli embrioni ed evita alla donna di doversi sottoporre a più cicli di stimolazione ovarica, aumentando le possibilità di intraprendere una gravidanza e allo stesso tempo superare i problemi di natura etica legati a una sovra-produzione di embrioni. Questa tecnica permette inoltre di tutelare la fertilità in soggetti con storia familiare di menopausa precoce e l'allestimento di banche dei programmi di ovodonazione delle unità di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA).

## 1.1 Crioconservazione

La crioconservazione (conservazione criogenica) è una tecnica che consente di preservare e conservare nel tempo il germoplasma delle diverse specie animali e dell'uomo a una temperatura di  $-197\text{ }^{\circ}\text{C}$  in azoto liquido. A queste temperature, enzimi o processi chimici che potrebbero causare danni alle cellule sono definitivamente bloccati (Sambu S., 2015).

I limiti principali della crioconservazione sono la possibilità di conservazione del germoplasma per un elevato numero di anni, la sopravvivenza di tessuti o gameti dopo scongelamento e la ripresa delle funzioni biologiche che permettono l'effettivo utilizzo di tale materiale nelle diverse pratiche di riproduzione assistita.

Il fenomeno che in tutte le tecniche di crioconservazione rappresenta il pericolo maggiore per cellule o tessuti è quello della formazione dei cristalli di ghiaccio nel comparto intracellulare causato da una eccessiva velocità di discesa termica, la quale non consente all'acqua di fuoriuscire adeguatamente dalla cellula (Mazur, 1963) che al contempo causa la formazione di ghiaccio nel comparto extracellulare (Mazur, 1980).

Durante la discesa termica le cellule sono sottoposte a forti stress, possono così riportare danni irreversibili che ne condizionano la ripresa allo scongelamento. Come riportato da Vajta e Nagy ( 2006) le fasi più critiche sono:

- $+15^{\circ}\text{C}$  ai  $-5^{\circ}\text{C}$ , si evidenzia un danno dato dal solo abbassamento della temperatura;
- $-5^{\circ}\text{C}$  ai  $-80^{\circ}\text{C}$ , si ha la formazione di ghiaccio intra ed extracellulare con conseguente lisi;
- $-50^{\circ}\text{C}$  a  $-150^{\circ}\text{C}$ , danni alla zona pellucida e al citoplasma;



- *150°C e i -196°C*, risulta essere la meno pericolosa poiché i processi chimico-enzimatici cellulari sono pressoché nulli (Vajta and Nagy, 2006).

### 1.1.1 Crioprotettori

Al fine di cercare di evitare o diminuire i danni cellulari dovuti alla crioconservazione, si è da tempo fatto ricorso all'impiego varie sostanze note come crioprotettori.

Dal 1949, a partire dall'uso involontario del Glicerolo durante un esperimento di Polge che migliorò notevolmente le percentuali di sopravvivenza cellulare dopo scongelamento, si sono succedute numerose sostanze volte a proteggere le membrane cellulari.

Tali sostanze, note come Agenti CrioProtettori (ACP), si dividono comunemente in crioprotettori penetranti e crioprotettori non penetranti.

I *crioprotettori penetranti* sono una famiglia di piccole molecole con PM < 400 Da, che hanno la capacità di superare la membrana cellulare. Essi fluiscono nel compartimento intracellulare, sostituendo la maggior parte delle molecole di acqua e formano legami ad idrogeno con le molecole acquose residue. Ciò porta ad un nelle soluzioni, Per le proprietà colligative, ad l'abbassamento del punto di congelamento con riduzione della di formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare.

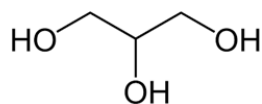
Nel processo di congelamento lento, questi crioprotettori penetranti, durante la lenta e graduale discesa termica, favoriscono l'inizio

della nucleazione del ghiaccio nel compartimento extracellulare. La presenza di nuclei cristallini extracellulari richiama l'acqua libera dal citoplasma, così da indurre una graduale disidratazione. Il limitato quantitativo di acqua libera intracellulare residuo favorisce la formazione di piccoli cristalli non dannosi.

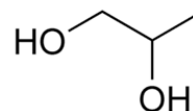
Al contrario, quando la concentrazione dei crioprotettori è molto elevata, combinata ad un raffreddamento estremamente rapido, si verifica la totale inibizione della cristallizzazione, favorendo il verificarsi del processo di “*vitrificazione*” (Saragusty et al., 2011).

L'aggiunta di crioprotettori penetranti prima del processo di congelamento, consente la riduzione degli effetti di soluzione. Infatti tali sostanze rimanendo in soluzione, diluiscono gli elettroliti che sono esclusi dall'acqua durante le fasi di solidificazione. Tante sono le molecole idonee all'utilizzo come agenti crioprotettori, tuttavia il loro limite è rappresentato dal fatto che la maggior parte di esse risultano tossiche per le cellule alle alte concentrazioni richieste per la vitrificazione.

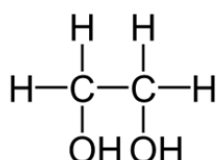
Le molecole maggiormente impiegate nella pratica, sono il glicerolo, glicole propilenico (PROH), etilen glicol (EG) e dimetilsolfossido (DMSO). Questi ultimi sono quelli che vengono maggiormente usati ad una concentrazione dell'ordine di 1.0 – 1.5 M (Saragusty et al. 2011).



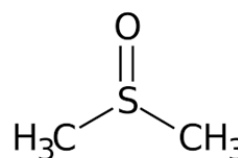
**Glicerolo**



**Glicole Propilenico**



**Etilen Glicol**

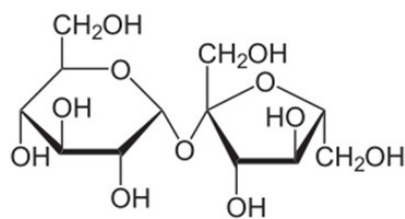


**Dimetilsolfossido**

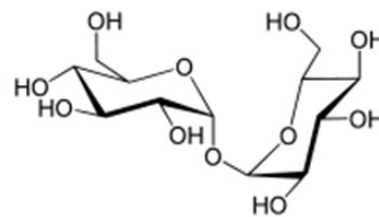
**Figura 1:** Crioprotettori penetranti.

I *crioprotettori non penetranti* sono costituiti da molecole ad alto peso molecolare, solitamente  $PM > 1000$  Da, non in grado di attraversare la membrana cellulare. La maggior parte sono molecole zuccherine la cui funzione è quella di richiamare acqua al di fuori della cellula, favorendone la disidratazione. Possono esercitare un effetto protettivo nei confronti delle membrane, interagendo e stabilizzando le teste idrofiliche dei fosfolipidi.

Esempi di crioprotettori non penetranti comunemente utilizzati sono il saccarosio, glucosio, fruttosio, trealosio e alcune proteine (Barcelo-Fimbres et al., 2007). L'uso ad esempio del saccarosio nella soluzione di scongelamento previene lo shock osmotico promuovendo un veloce rilascio dei crioprotettori permeabili impedendo la lisi cellulare (Jain and Paulson, 2006).



**Saccarosio**



**Trealosio**

**Figura 2:** Crioprotettori non penetranti.

Quando queste sostanze sono utilizzati in combinazione con crioprotettori penetranti, essi ne facilitano l'ingresso nel compartimento intracellulare. I crioprotettori non penetranti, svolgono un ruolo fondamentale nel prevenire lo shock osmotico durante lo scongelamento, che può verificarsi quando il crioprotettore non abbandona la cellula abbastanza velocemente.

La presenza di alte concentrazioni di crioprotettori non penetranti favorisce, per questioni osmotiche, il più rapido rilascio dei crioprotettori penetranti. Contemporaneamente, aumentando la concentrazione di soluti nel compartimento extracellulare, i crioprotettori non penetranti si oppongono al richiamo di acqua nel citosol, prevenendo la lisi cellulare (Jain et al., 2006).

Un aspetto fondamentale per un ACP è la capacità di abbassare il punto di congelamento della soluzione. In generale i ACP risultano però spesso tossici ed è importante bilanciarne adeguatamente la concentrazione e i tempi di esposizione, per evitare ulteriori danni causati dalla loro tossicità.

## 1.2 Tecniche di Crioconservazione

Attualmente, le principali tecniche impiegate in ambito criobiologico, per la crioconservazione di gameti embrioni e tessuti sono costituite dal “congelamento” e dalla “vitrificazione”.

### 1.2.1 Congelamento

Le procedure di congelamento impiegate sono definite *lento*, *rapido* e *ultrarapido*.

Il *congelamento lento* prevede uno scambio di liquidi tra gli spazi intra ed extracellulari E' considerata una tecnica abbastanza sicura che evita shock osmotici o deformazioni della membrana cellulare. (Mazur P. 1990). Le concentrazioni di crioprotettori che vengono usate sono basse, così da prevenire i danni tossici e di tipo osmotico. Al contrario però l'impiego di basse concentrazioni di crioprotettori potrebbero risultare insufficienti per evitare la formazione dei cristalli di ghiaccio nello step in cui la temperatura è compresa tra i  $-5^{\circ}\text{C}$  e i  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Limiti del congelamento sono rappresentati da tempi lunghi di esecuzione e prezzi elevati dei macchinari utilizzati.

Nel congelamento lento le temperature raggiunte sono tra i  $-30^{\circ}\text{C}$  e i  $-40^{\circ}\text{C}$  poi in seguito campioni possono essere immersi in azoto liquido. La velocità di congelamento è compresa tra i  $0.3^{\circ}\text{C}$  e  $1^{\circ}\text{C}$  / minuto.

Durante lo scongelamento i campioni sono esposti ad una temperatura di  $37^{\circ}\text{C}$ , prevedendo una rapida risalita termica, in soluzioni contenenti crioprotettori a concentrazioni decrescenti per

evitare la formazione di piccoli cristalli di ghiaccio e minimizzare gli stress osmotici.

Il *congelamento rapido* prevede l'esposizione del campione a una soluzione contenente uno o più crioprotettori e una fase di equilibratura a temperatura ambiente per un tempo variabile che dipende dal peso molecolare dello stesso crioprotettore. I campioni vengono poi esposti a -70 °C e immersi in azoto liquido.

Un tipo di congelamento che può considerarsi un intermedio tra il congelamento lento e la vitrificazione è quello chiamato *ultra rapido*. E' più veloce di un congelamento tradizionale ma non necessita di sistemi computerizzati, ma rispetto alla vitrificazione utilizza concentrazioni di ACP più basse (Trounson and Sjoblom, 1988; Trounson et al, 1987).

### **1.2.2 Effetti del congelamento**

Il congelamento è un processo delicato durante il quale possono verificarsi danni cellulari di vario tipo, principalmente possono essere di tipo meccanico, osmotico e tossico. E' noto come durante l'esposizione alle basse temperature il congelamento abbia inizio a livello extracellulare con la formazione dei cristalli di ghiaccio. Con il progressivo abbassamento delle temperature la dimensione dei cristalli aumenta fino a comprimere le cellule determinando un danno meccanico a livello della membrana plasmatica. In aggiunta, quando la velocità di raffreddamento non è sufficientemente

elevata, la cristallizzazione dell'acqua extracellulare espone le cellule a forti gradienti osmotici, provocandone la disidratazione: il liquido passa nel compartimento esterno dove la concentrazione dei soluti progressivamente aumenta mentre l'acqua viene "sequestrata" per la formazione dei cristalli di ghiaccio.

Se da un lato la presenza dei crioprotettori previene la formazione dei cristalli, dall'altra è stato riportato come la loro presenza determini effetti tossici dose e tempo dipendenti (Wang et al. 2007). Numerose sono le tecniche utilizzate per la valutazione degli effetti indotti dalla crioconservazione. Fondamentali risultano i test di vitalità, aventi lo scopo da un lato di predire la qualità di un campione sottoposto a crioconservazione, dall'altro di ottimizzare le tecniche di crioconservazione.

I test di vitalità possono essere di diverso tipo e complessità. Essi vengono classificati in base alle funzioni che misurano in:

- Test di integrità fisica: valutano l'integrità di membrana utilizzando particolari colorazioni che non vengono assunte dalle cellule vive, per esempio eosina, trypan blue, nigrosina e ioduro di propidio;
- Test di attività metabolica: il test con nitro blu di tetrazolio (NBT) e il test con diacetato di fluoresceina (FDA);
- Test di attività meccanica: dimostrano la vitalità della cellula grazie ai suoi cambiamenti in dimensione, posizione e adesione. Molte cellule ad esempio sono motili e questa caratteristica può essere osservata al microscopio, per esempio gli spermatozoi.

Inoltre, essendo la trascrizione la prima risposta biologica adattativa a una sollecitazione esterna, lo studio dei profili di

espressione genica può essere un valido strumento per la misurazione delle modificazioni indotte dalla crioconservazione. Sono possibili due tipologie di analisi: studio dell'intero trascrittoma, tramite microarray o RNA-Seq, o di un sottoinsieme di geni, tramite Real Time PCR.

Infine ricordiamo che la crioconservazione è in grado di indurre alterazioni macromolecolari e biochimiche nelle cellule. Alcuni studi mettono in evidenza come il trattamento termico possa danneggiare la struttura del citoscheletro. Modificazioni a carico dell'organizzazione della F-actina e indotte dal congelamento sono state messe in evidenza tramite analisi di microscopia ottica polarizzata e microspettroscopia Raman (Bogliolo et al. 2015). Allo stesso modo, il confronto tra profili fosfolipidici di oociti freschi e vitrificati, analizzati tramite spettrometria di massa, ha dimostrato che numerose specie di fosfolipidi sono ridotte negli oociti vitrificati (Junget et al. 2014). Per concludere, sottolineiamo come l'utilizzo delle basse temperature per la conservazione di campioni cellulari abbia un effetto dannoso anche sulla composizione dei carboidrati del glicocalice, alterando così la funzione delle proteine di membrana responsabili del trasporto di ioni e metaboliti (Talaie et al. 2010).

### **1.3 Vitrificazione**

La vitrificazione è una tecnica caratterizzata da un rapido passaggio del campione della temperatura ambiente fino a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Le cellule sono esposte a gradienti particolarmente elevati con un decremento termico che va da centinaia a decine di migliaia di gradi Celsius/min, dipendendo dal volume, conducibilità e soluzioni utilizzate (Yavin & Arav 2007).



Il nome della metodologia si riferisce all'aspetto macroscopico assunto dal campione, che appare chiaro e trasparente, simile al vetro perla formazione di una trama vetrosa nella soluzione di vitrificazione (Vajta and Nagy 2006).

E' una tecnica che, comparata al congelamento risulta più semplice, veloce e non necessita di costose e particolari strumentazioni. D'altra parte la concentrazione di crioprotettori usata è più elevata, infatti, essi incrementano la viscosità delle soluzioni e, nella fase di passaggio di stato, favoriscono la costituzione di una trama vetrosa evitando la formazione di cristalli di ghiaccio. Il volume delle soluzioni di vitrificazione nelle quali le cellule sono poste rappresenta altresì un fattore essenziale nella vitrificazione, più basso sarà il volume e più alta sarà la probabilità che avvenga la vitrificazione.

E' stato ampiamente dimostrato infatti che alla diminuzione del volume delle soluzioni di vitrificazione corrisponde un aumento della velocità di raffreddamento (Arav, 1992; Arav et al., 2002; Yavin and Arav, 2007).

L'aspetto meno incoraggiante di tale metodologia è sicuramente dato dal necessario utilizzo di alte dosi di crioprotettori che, inevitabilmente, causano danni tossici e osmotici alle cellule. Durante gli anni si è cercato di ovviare a tale problematica sia scegliendo tra i crioprotettori meno dannosi, e tra questi il Glicole Etilenico sicuramente è uno dei più utilizzati in quanto altamente permeabile e meno tossico, sia cercando di abbinare le caratteristiche di più sostanze scegliendo tra un ACP penetrante e uno o più non penetranti. Tra le soluzioni più usate di ACP

penetranti ricordiamo quella tra il Glicole etilenico e il Dimetilsulfosido (Ishimori et al., 1992a, b; Ishimori et al., 1993).

Tra gli ACP non penetranti invece particolarmente usati sono i disaccaridi saccarosio e trealosio, quest'ultimo ha permesso infatti di ottenere risultati particolarmente incoraggianti in quanto dopo crioconservazione viene facilmente eliminato dalle cellule permettendone il successivo sviluppo (Eroglu et al., 2005).

Il ripristino della temperatura rappresenta una fase essenziale poiché si potrebbe avere il rigonfiamento della cellula dovuto al rilascio del crioprotettore intracellulare. Per evitare che questo avvenga usualmente vengono usate soluzioni di ripristino della temperatura con concentrazioni decrescenti di saccarosio (Vajta and Nagy, 2006).

Le combinazioni di crioprotettori sono scelte in modo da incrementare la viscosità della soluzione stessa. Al fine di migliorare la stabilità delle membrane è utile aggiungere alle soluzioni di vitrificazione una componente proteica, come ad esempio albumina sierica bovina (BSA) o siero fetale bovino (FCS).

Una strategia che può limitare la sofferenza cellulare è rappresentata dall'espore il campione a delle soluzioni di equilibratura che contengono concentrazioni inferiori di ACP prima di esporlo alle effettive soluzioni di vitrificazione (Massip, 2001).

Anche il tipo di dispositivo utilizzato come supporto per la vitrificazione dei campioni può rappresentare un'ulteriore fattore che può inficiare il risultato della vitrificazione. Ciò che attualmente si cerca di fare è infatti ottimizzare o creare nuovi

dispositivi che riducano i volumi utilizzati e permettano di aumentare il tasso di raffreddamento. In questo modo si potrebbero ridurre le concentrazioni di crioprotettori e limitando gli effetti tossici e osmotici sulle cellule (Yavin et al., 2009).

### 1.3.1 Dispositivi per la Vitrificazione

Come già descritto sopra, il target degli ultimi anni è stato quello di creare nuovi dispositivi che permettessero l'ottimizzazione delle tecniche di vitrificazione e di ripristino della temperatura. Diversi sono i devices proposti e utilizzati, i quali possono essere suddivisi in due categorie:

- sistemi aperti,
- sistemi chiusi.

I *sistemi aperti*, prevedono un contatto diretto tra campione e l'azoto liquido, permettendo così di aumentare la velocità di raffreddamento e di scongelamento e allo stesso tempo di controllare il volume della soluzione di vitrificazione. Il contatto diretto tra campione e azoto potrebbe altresì favorire contaminazioni microbiche.

<i>Sistemi di vitrificazione</i>	<i>Anno</i>	<i>Autore</i>
----------------------------------	-------------	---------------

<i>Cryotop</i>	2000	Kuwayama and Kato
<i>Cryoloop</i>	1999	Lane et al.
<i>Griglia per microscopia elettronica</i>	1990	Steponkus et al.
<i>Cryoleaf</i>	2005	Chian et al.
<i>Open pulled straw (OPS)</i>	1997	Vajta et al.

**Tabella 1:** sistemi di vitrificazione aperti più usati.

I *sistemi chiusi* basano il loro funzionamento sul mancato il contatto diretto tra il campione e l'azoto, ciò ad discapito della velocità di raffreddamento e di ripristino della temperatura, che sono inferiori rispetto ai sistemi aperti.

I più utilizzati sono:

<b><i>Sistemi di vitrificazione</i></b>	<b><i>Anno</i></b>	<b><i>Autore</i></b>
<i>Straw in plastica sigillata</i>	1985	Rall and Fahy
<i>Close pulled straw (CPS)</i>	2001	Chen et al.
<i>Cryotip</i>	2005	Kuwayama et al.
<i>Cryopette</i>	2010	Portman et al

**Tabella 2:** sistemi di vitrificazione chiusi più usati.

Come dimostrato da numerosi gruppi di ricerca la scelta del dispositivo è dunque uno dei focus maggiori quando si procede alla crioconservazione di germoplasma attraverso la tecnica della vitrificazione.

## 1.4 Liofilizzazione o Freeze Drying

Tra le tecniche innovative che negli ultimi anni sono state valutate per migliorare la conservazione del germoplasma, una che sicuramente può produrre svariati vantaggi è la liofilizzazione o Freeze-Drying.

La tecnica si basa sul processo della sublimazione, cioè consiste nel sottrarre acqua da un componente idratato. Il processo si verifica quando l'acqua allo stato solido subisce una trasformazione allo stato di vapore se sono presenti tre condizioni: congelamento, diminuzione della pressione a valori inferiori rispetto al punto triplo dell'acqua (<6,10 mbar= 4,58 mmHg) e calore.

Durante il procedimento la formazione dei cristalli di ghiaccio deve essere immediatamente seguita dalla sublimazione dell'acqua. Infatti durante la prima fase di congelamento si verifica la formazione di cristalli di ghiaccio, le cui dimensioni influiscono sulla velocità di sublimazione. Se il congelamento avviene troppo rapidamente si formano cristalli di ghiaccio intracellulari con sublimazione lenta, al contrario se la velocità di congelamento è troppo bassa si formano cristalli di grandi dimensioni che sublimano più facilmente ma sono responsabili di danni meccanici da compressione cellulare.

Tale procedura di liofilizzazione è fisiologicamente effettuata in natura da alcuni organismi detti anidrobionti, capaci di sopravvivere riducendo la percentuale liquida dell'organismo del 98%-99% La possibilità della conservazione per lunga durata a temperature superiori allo zero di materiale seminale, tessuti, gonadi o embrioni sarebbe infatti un obiettivo strategico in campo umano ed animale. Tale successo permetterebbe infatti di abbattere

i costi di conservazione e trasporto, facilitando di fatto l'attuazione a livello internazionale di tali tecniche e la fruizione ad un pubblico sempre più vasto, in campo umano e animale.

Già nel 1949 Polge et al. riuscirono a ottenere spermatozoi vitali dopo vitrificazione e disidratazione, e da allora l'interesse scientifico verso una procedura che con innumerevoli vantaggi potrebbe permettere di non essere più legati alla crioconservazione, si è fatto sempre più grande. Negli anni '60 sono state eseguite prove di liofilizzazione su materiale seminale di bovino e uomo, in seguito sono state effettuate prove in numerose altre specie come gatto, cane e suino si sono eseguiti vari tentativi (Moisan et al. 2005, Magalhaes et al. 2016). Come riportato nella letteratura scientifica, con l'utilizzo di questa tecnica sono stati ottenuti individui vivi e vitali sia nel topo che nel coniglio (Wakayama et al. 1998, Liu et al. 2004).

Oltre ai gameti altri tipi cellulari sono stati sottoposti con successo al freeze-drying, come globuli rossi, fibroblasti e cellule cordonali (Arav et al. 2011, Natan et al. 2009).

## 2 SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro ha l'obiettivo di contribuire allo sviluppo di nuove metodologie per la crioconservazione del germoplasma nella specie ovina.

La ricerca è stata indirizzata prevalentemente all'individuazione di tecniche e dispositivi nuovi per la conservazione di seme, tessuti ed embrioni in maniera duratura ed efficace, risparmiando su tempi e risorse.

La ricerca si è articolata in tre esperimenti principali. Nel primo si è testata la possibilità di conservazione del seme dopo partial freeze-drying, una nuova tecnica che potrebbe permettere di ovviare all'utilizzo dell'azoto e dell'intera catena del freddo, con vantaggi enormi in termini di costi e fattibilità. Un nuovo micro-dispositivo per la vitrificazione (E.Vit) è stato invece utilizzato per la creazione di due protocolli per la crioconservazione di tessuto testicolare di animali prepuberi e di embrioni allo stadio di blastocisti, descritti nel secondo e nel terzo esperimento.

I risultati della presente ricerca contribuiscono all'ottimizzazione delle tecniche di conservazione della fertilità nei piccoli ruminanti, e potrebbero essere applicate anche in campo umano.

### **3 ESPERIMENTO 1: APPLICAZIONE DELLA TECNICA DEL PARTIAL FREEZE-DRYING AL CONGELAMENTO DEL SEME DI ARIETE (HIGH POST-THAW SURVIVAL OF RAM SPERM AFTER PARTIAL FREEZE-DRYING).** **Published on line 14 March 2018 Journal of Assisted Reproduction and Genetics.**

#### **3.1 Introduzione**

Lo scopo di questo primo esperimento è stato quello di testare una nuova tecnica per la crioconservazione del materiale seminale di ariete. La tecnica attualmente più utilizzata per la conservazione dello seme è il congelamento in azoto liquido. Questa metodica richiede l'impiego di strutture specializzate, personale qualificato, alimentazione continua di azoto liquido, che comportano un livello elevato dei costi (Arav et al. 2016). Di non trascurabile rilevanza sono inoltre i problemi legati alla sicurezza, per il potenziale rischio di trasmissione di agenti patogeni tra i campioni, problematiche di importante rilievo nella pratica clinica (Bielanski, 2012). Per tutti questi motivi, individuare un sistema alternativo di crioconservazione del materiale seminale che permetta di superare questi limiti è altamente auspicabile.

Come già precedentemente descritto, una nuova strada che si tenta di intraprendere in questo campo è quella di poter gradualmente sostituire l'utilizzo della crioconservazione con basse temperature con nuove metodologie alternative. In particolar modo il *Freeze-*

20



*Drying* (Liofilizzazione) è un metodo valido e potrebbe essere un sistema alternativo nel superare i problemi e i rischi descritti in precedenza ( Crow et al., 2005; Gil et al., 2014). La possibilità di disidratare il germoplasma e renderlo conservabile a temperatura ambiente sarebbe un grosso passo in avanti in termini di risparmio in attrezzature, stoccaggio materiali e praticità di lavoro.

La cristallizzazione e ricristallizzazione del ghiaccio durante le fasi di congelamento e scongelamento contribuiscono in maniera significativa al danno cellulare e alla morte delle cellule. Per questa ragione, evitare o minimizzare la cristallizzazione e la ricristallizzazione, potrebbe facilitare il mantenimento delle proprietà fisiologiche delle cellule dopo il processo di congelamento-scongelamento e il freeze-drying.

Questi danni cellulari si verificano maggiormente quando i campioni sono congelati in grandi volumi ( Arav et al., 2007), o quando lo scongelamento o il ripristino della temperatura sono eseguiti rapidamente (Arav , 2003).

In questo esperimento per il Freeze-Drying è stato utilizzato un nuovo sistema chiamato **Darya** (FertileSafe, Nes-Ziona, Israel), che permette di raggiungere una temperatura di condensazione controllata fino ai -110 °C e una pressione col vuoto di 10-100mTorr che viene raggiunta in meno di 10 secondi. Tale processo è perciò in grado di ridurre i processi di ri-cristallizzazione che accadono alle basse temperature dato che la velocità di sublimazione supera quella di ricristallizzazione. Ciò avviene in tempi molto veloci e il risultato è che la quantità di frazione non congelata, nella quale le cellule sono immerse, è maggiore.

Già nel 1989 Mazur and Cole (Mazur and Cole, 1989) dimostrarono, negli spermatozoi di ariete che le dimensioni della quota non congelata erano inversamente proporzionali al danno cellulare.

Per quanto concerne la scelta dei crioprotettori per l'esperimento, questi sono stati scelti in base ai risultati ottenuti da Sitaula et al. (2010). Gli autori dimostrarono infatti che usando trealosio e il sorbitolo come crioprotettori nel seme bovino parzialmente disidratato, si riuscivano ad ottenere tassi di sopravvivenza e vitalità maggiori rispetto ai tradizionali crioprotettori. Tale dato potrebbe essere riconducibile al fatto che il sorbitolo penetra la membrana cellulare e fornisce maggiore protezione alla cellula durante il processo di freeze-drying.

Alla luce dei risultati ottenuti dagli altri autori lo scopo dell'esperimento è stato quello di effettuare delle procedure di partial-freeze-drying nel materiale seminale di ariete. Il seme di ariete è molto sensibile allo stress osmotico ad esempio se paragonato al seme di uomo (Curry et al., 1994), quindi abbiamo ipotizzato che il sorbitolo penetrando all'interno delle cellule, riduca i danni osmotici, azione combinata all'effetto positivo del trealosio nella fase di liofilizzazione (Guo et al., 2000).

L'obiettivo di questo studio è stato quello di incrementare le percentuali di motilità del seme di ariete dopo lo scongelamento, in seguito all'impiego del Freeze-Drying.

### **3.2 Materiali e metodi**

### 3.2.1 Preparazione del materiale seminale

I campioni di seme sono stati collezionati da 3 arieti di razza Sarda di età compresa tra i 3 e i 5 anni, messi insieme a formare un unico campione. Sono stati analizzati concentrazione e motilità usando il sistema di analisi CASA (Ivos, Hamilton Thorne, Biosciences), e sono stati presi in considerazione solo i campioni che avessero almeno l'85% di motilità.

I campioni idonei ad essere impiegati nell'esperimento, sono stati diluiti in due soluzioni differenti fino ad ottenere una concentrazione di 50 milioni di spermatozoi/ ml.

Le soluzioni impiegate per la diluizione sono:

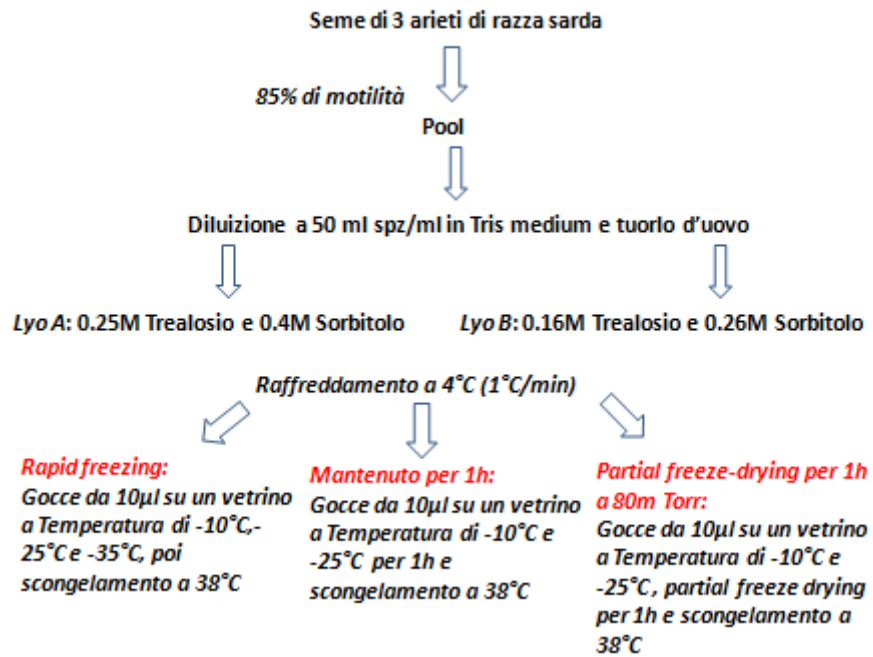
1. **Lyo A:** 0,25 M Trealosio, 0,4 M Sorbitolo in 0,2M Tris Medium e 20% tuorlo d'uovo.
2. **Lyo B:** 0,16 M Trealosio, 0,26 M Sorbitolo in 0,2M Tris Medium e 20% tuorlo d'uovo.

In seguito a diluizione i campioni sono stati refrigerati a 4°C a una velocità di 1°C/min e riesaminati per valutare i parametri di motilità col sistema CASA

Il materiale seminale è stato così processato:

- 1) congelamento a varie temperature (-10°C, -25°C, -35°C) e scongelato;
- 2) congelamento per un'ora a due temperature (-10°C, -25°C), e scongelato;

3) congelamento a due temperature (-10°C, -25°C) e sottoposto a partial freeze-drying a una pressione di 80mTorr per un' ora prima dello scongelamento.



**Figura 3:** rappresentazione schematica dell'esperimento.

### 3.2.2 Congelamento e scongelamento del seme

Nella prima parte dell'esperimento è stata valutata la motilità del seme dopo congelamento a diverse temperature (10°C, -25°C e -35°C) e scongelamento.

La procedura consisteva nel porre gocce di seme aventi volume di 10µl, su un vetrino copri oggetto precedentemente raffreddato a temperature di: -10°, -25° e -35°C. Le gocce sono state lasciate alle

varie temperature per 10 minuti e successivamente poste su una piastra riscaldata alla temperatura di 38°C per lo scongelamento.

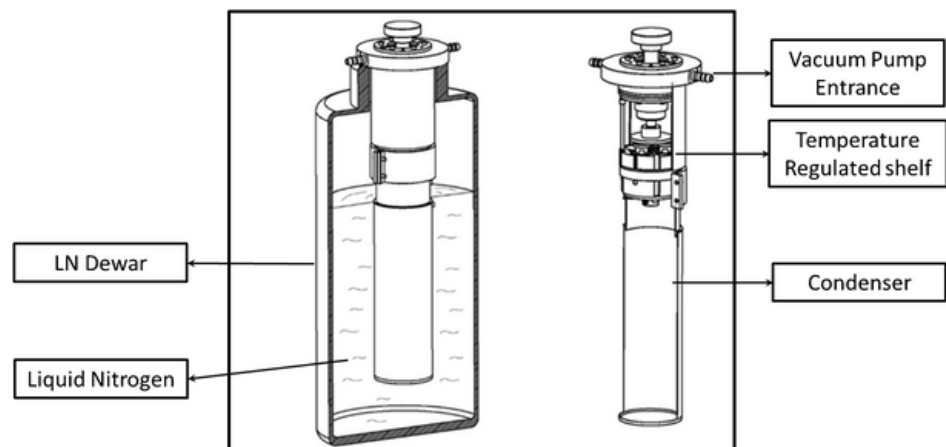
Tale procedimento è stato ripetuto per il seme diluito con entrambe le soluzioni, Lyo A e LyoB. Sono stati eseguiti 3 replicati a intervalli di una settimana uno dall'altro.

In una seconda fase, si è proceduto a congelare il seme alla temperatura di -10°C e -25°C, in gocce di 10 µl con le soluzioni Lyo A e Lyo B mantenute per 1h a tali temperature prima dello scongelamento.

### 3.2.3 Freeze-Drying

Nella terza parte dell'esperimento il seme diluito nelle soluzioni Lyo A e Lyo B, è stato congelato a due diverse temperature (-10°C e -25°C) per 5 minuti e immediatamente dopo sottoposto a Partial Freeze-Drying (PFD) per 1h.

Per il Partial Freeze-Drying è stato utilizzato il dispositivo **Darya** (FertileSafe, Nes-Zion, Israel), impostato a una temperatura di condensazione controllata e una pressione del vuoto di 80mTorr che viene raggiunta in meno di 10 secondi.



**Figura 4:** Immagine schematica del macchinario Darya (FertileSafe FSD).

La macchina è composta da un cilindro metallico con volume di 1L e due compartimenti: un condensatore che viene posto in azoto liquido e uno scomparto per i campioni nel quale può essere regolata la temperatura e essere connesso a una pompa del vuoto. Dopo 5 minuti di congelamento alle temperature di -10 °C e -25 °C sono stati posti a liofilizzare per 1h dai 3 ai 5 campioni, e in seguito sono stati scongelati.

Tale procedimento è avvenuto appoggiando i vetrini copri oggetto su una piastra riscaldata a 38 °C per 30 secondi.

### **3.2.4 Volume e peso**

Prima e dopo il Partial freeze-drying effettuato alle temperature di -10 °C e -25 °C si è proceduto alla misurazione del volume e del peso delle gocce di seme con l'utilizzo di una pipetta calibrata e una bilancia di precisione (Sartorius ED224S, Göttingen, Germany).

### **3.3 Analisi Statistica**

L'analisi statistica è stata eseguita usando il software STATA \ IC 11.0. I dati relativi alla motilità spermatica sono stati analizzati con il test Chi-quadro con fattore di correzione Bonferroni. Le

differenze con  $P < 0,05$  sono state considerate statisticamente significative.

### 3.4 Risultati

#### 3.4.1 Motilità dopo congelamento e scongelamento del seme

I risultati ottenuti con il sistema di analisi CASA, inerenti la motilità spermatica, dopo diluizione dei campioni nelle soluzioni di crioprotettori *Lyo A* e *Lyo B*, hanno evidenziato un decremento della motilità dall'86% al 30%, impiegando la soluzione *Lyo A* ( $P < 0,05$ ). Il decremento registrato appare significativo ma solo temporaneo, infatti dopo 2 minuti la motilità spermatica incrementava con valori del 60%.

Con l'impiego della soluzione *Lyo B* non si è registrato alcun calo nella motilità spermatica e subito dopo la discesa a 4°C si sono registrate percentuali di motilità del 67%.

I dati ottenuti in seguito al congelamento alle varie temperature sotto lo zero, -10 °C, -25 °C e -35 °C, mostrano come dopo lo scongelamento la motilità del seme esposto a *Lyo A* era rispettivamente del 35%, 36% e 38%.

Il seme esposto a *Lyo B* aveva una motilità superiore se congelato alle temperature di -10 °C, -25 °C, con valori rispettivamente del 64,5% e 64%, rispetto al seme esposto alla temperatura di -35 °C che evidenziava un decremento della motilità, con valori del 31%, come mostrato in Tabella 1.

<i>Rapid Freezing</i>		
<i>Temperatura</i>	<i>Motilità dopo scongelamento</i>	
	<i>Lyo A</i>	<i>Lyo B</i>
<i>Seme fresco</i>	86% ± 2% a	86% ± 2% a
<i>4 °C</i>	61% ± 3.21% b	67% ± 2% b
<i>-10 °C</i>	35% ± 7.07% c	64.5% ± 5.25% b
<i>-25 °C</i>	36% ± 4.78% c	64.% ± 4.89% b
<i>-35 °C</i>	38% ± 2.44% c	31% ± 2.5% c

**Tabella 3:** Motilità spermatica dopo scongelamento alle diverse temperature utilizzando due differenti soluzioni (Lyo A e Lyo B). I valori sono espressi come medie ± SD. Le diverse lettere indicano differenze significative nella motilità spermatica in confronto a temperatura e soluzioni (P < 0.05).

I dati inerenti la motilità del seme congelato e mantenuto per 1h a -10 °C e -25 °C, hanno indicato che solo una bassa percentuale di seme era motile (<10%), mentre il seme risultava immobile dopo lo scongelamento a -35 °C (Tabella 2).

<i>Congelamento per 1h</i>		
<i>Temperatura</i>	<i>Motilità dopo scongelamento</i>	
	<i>Lyo A</i>	<i>Lyo B</i>
<i>-10 °C</i>	3% ± 1.4% a	3% ± 1.4% a
<i>-25 °C</i>	3.3% ± 2.8% a	1.2% ± 2.5% a
<i>-35 °C</i>	/	/

**Tabella 4:** Motilità spermatica dopo congelamento per 1h e scongelamento con l'utilizzo di due diverse soluzioni (Lyo A e Lyo B). I valori sono espressi come medie ± SD. Le lettere indicano differenze significative tra righe e colonne (P < 0.001).

### 3.4.2 Freeze-Drying



I risultati inerenti l'impiego del macchinario Darya (FertileSafe, Nes-Ziona, Israel) per il PFD, hanno evidenziato come a -10 °C la motilità del materiale seminale era inferiore al 10%, utilizzando sia la soluzione Lyo A che Lyo B a valori di 80m Torr, mentre a -25°C e con valori di 80mTorr, la soluzione Lyo A ha permesso di ottenere il 35% di motilità, la Lyo B del 46,6% (Tabella 3). Sulla base dei risultati del congelamento alla temperatura di -35°C per 1h, si è optato per non eseguire il PFD a tali temperature.

<i>Partial freeze-drying</i>		
<i>Temperatura</i>	<i>Motilità dopo Partial freeze-drying e scongelamento</i>	
	<i>Lyo A</i>	<i>Lyo B</i>
<i>-10 °C</i>	6.5% ± 2% a	8% ± 1.2% a
<i>-25 °C</i>	35% ± 4% b	46.6% ± 2.8% b

**Tabella 5:** Motilità spermatica dopo Partial freeze-drying e scongelamento con l'utilizzo di due diverse soluzioni (Lyo A e Lyo B). I valori sono espressi come medie ± SD. Le lettere indicano differenze significative tra righe e colonne (P< 0.001) .

I dati sulla riduzione di volume e di peso in seguito a Freeze-Drying sono riportati nella Tabella 6.

A - 10 °C con la soluzione Lyo A hanno mostrato come da un volume iniziale di 80 µl si avesse una riduzione del volume del 5% (76 µl). Per quanto concerne il peso si è avuta una riduzione del 6,5%, in quanto inizialmente il peso era di 92 mg ed è stato ridotto

a 86 mg. A -25 °C utilizzando la soluzione Lyo A il volume si è ridotto del 12,5%, da un volume iniziale di 80 µl c'è stata una riduzione a 70 µl. In queste condizioni il peso è variato del 13%, inizialmente era di 92 mg, si è ridotto a 80 mg.

L'impiego del *Lyo B* a -10 °C ha fornito i seguenti risultati con una riduzione del volume del 6,25%, da un volume iniziale di 80 µl a 75 µl. Il peso, che era inizialmente 92 mg, è stato ridotto a 84 mg (8,7%).

Alla temperatura di -25 °C con *Lyo B* i risultati ottenuti hanno mostrato una riduzione del volume del 18,75% (volume iniziale di 80 µl era ridotto a 65 µL), il peso che era inizialmente 92 mg, è stato ridotto a 71 mg (22,8%).

<i>Misurazioni di peso e volume dopo Partial freeze-drying</i>						
<i>T (°C)</i>	<i>Lyo A</i>					
	<b>Volume pre-PFD</b>	<b>Volume post-PFD</b>	<b>Variazione %</b>	<b>Peso pre-PFD</b>	<b>Peso post-PFD</b>	<b>Variazione %</b>
<i>-10°C</i>	80µl	76µl	5%	92mg	86mg	6.5%
<i>-25°C</i>	80µl	70µl	12.5%	92mg	80mg	13%
<i>T (°C)</i>	<i>Lyo B</i>					
	<b>Volume pre-PFD</b>	<b>Volume post-PFD</b>	<b>Variazione %</b>	<b>Peso pre-PFD</b>	<b>Peso post-PFD</b>	<b>Variazione %</b>

<b>-10°C</b>	80µl	75µl	6.25%	92mg	84mg	8.7%
<b>-25°C</b>	80µl	65µl	18.75%	92mg	71mg	22.8%

**Tabella 6:** La tabella indica i valori e le variazioni di volume e peso del materiale seminale prima e dopo il trattamento di Partial freeze drying con l'utilizzo delle due differenti soluzioni (Lyo A e Lyo B).

### 3.5 Discussione

Sin dalla metà del secolo scorso uno degli obiettivi della biologia è stato quello di riuscire a crionservare nel tempo cellule e tessuti. Nell'ambito della riproduzione inoltre lo scopo è stato quello di riuscire a mantenere inalterate le caratteristiche del germoplasma, in modo da poter impiegare tale materiale in tempi successivi.

Nel corso degli anni diverse sono state le tecniche sperimentate impiegando la disidratazione come tecnica di preservazione del materiale germinale. I primi studi sono stati effettuati da Poulge e i suoi collaboratori (1949), che tentarono di congelare e disidratare il materiale seminale di pollo. Negli anni successivi, l'interesse dei ricercatori si focalizzò sul ruolo, l'importanza e l'impiego dei crioprotettori. Tra i crioprotettori maggiormente impiegati gli zuccheri come il Saccarosio, Trealosio e il Sorbitolo, rivestono un ruolo importante per le loro caratteristiche di aumentare la concentrazione di soluti extra cellulari generando un gradiente osmotico che conduce l'acqua fuori dalla cellula, causando la sua disidratazione prima della procedura di congelamento.

Tra le tecniche di crioconservazione che tutt'oggi si cerca di migliorare e standardizzare, la liofilizzazione è una tecnica che richiede l'ottimizzazione di tre procedure principali: congelamento, essiccazione e reidratazione.

Nella prima fase sperimentale del lavoro lo scopo è stato quello di testare l'effetto delle basse temperature sul seme di ariete diluito in due soluzioni composte da diverse concentrazioni di Trealosio e Sorbitolo, tuorlo d'uovo e Tris, denominate Lyo A e Lyo B.

Nella procedura di congelamento i campioni di seme congelati con soluzione Lyo A hanno mostrato una significativa riduzione della motilità post scongelamento (PTM). Tale effetto potrebbe essere spiegato dallo stress osmotico che subiscono le cellule dovuto alla maggiore concentrazione di crioprotettori utilizzati. Infatti abbiamo osservato come le concentrazioni più elevate di CP nella Lyo A riducano significativamente la motilità degli spermatozoi al momento della diluizione del seme. Tuttavia, tale diminuzione della motilità, rilevata dopo la diluizione, non è stata osservata quando il seme è stato raffreddato alla temperatura di 4 ° C.

Quando i campioni di seme diluiti nella soluzione Lyo A, sono stati esposti a - 10 °C e - 25° C, è stato osservato un valore significativamente inferiore di PTM rispetto a quelli diluiti in Lyo B.

Nei campioni esposti a - 35 °C, i risultati ottenuti sono stati simili tra i gruppi Lyo A e Lyo B, ma il dati del gruppo Lyo B erano significativamente inferiori rispetto a quelli ottenuti quando congelati a temperature più elevate.

Alla luce dei risultati ottenuti nella prima fase sperimentale, le temperature più elevate (-10 e -25 °C), sono state quelle impiegate negli esperimenti di congelamento e scongelamento.

Quando i campioni di seme sono stati esposti a temperature sotto lo zero (- 10 e - 25 °C) per 1 h, sia il seme diluito con Lyo A che il Lyo B ha mostrato una significativa diminuzione del PTM. Tale dato è probabilmente dovuto a danni di ricristallizzazione causati dalle temperature sotto lo zero testate. Tuttavia, quando i campioni di seme sono stati sottoposti a Partial freeze-drying a 80 mTorr per 1 h, i risultati ottenuti, hanno rivelato un PTM più elevato dopo il congelamento a -25 °C, nel gruppo Lyo B (46,6%) rispetto al Lyo A (35 %). Entrambi i campioni di Lyo A e Lyo B hanno mostrato una PTM significativamente inferiore dopo PFD a -10 °C che era leggermente superiore ai risultati ottenuti dopo il congelamento per 1 h.

La riuscita del processo di sublimazione è influenzato da una combinazione del vuoto e della temperatura alla quale il campione viene mantenuto. Poiché in questi esperimenti è stata applicata la stessa pressione del vuoto e solo la temperatura di discesa termica è stata variata, ovvero - 10 o - 25 °C, si presuppone che il danno evidenziato a - 10 °C fosse dovuto a un più alto tasso di sublimazione, che come è noto, è responsabile di maggiori danni a livello cellulare (Rindler et al., 1999).

Un altro fattore importante in grado di influenzare il processo di sublimazione è rappresentato dal volume del campione. Nell' esperimento eseguito nel nostro laboratorio, i campioni di seme sono stati congelati in gocce con un volume di 10 µl. Questo volume è stato scelto al fine di garantire un processo di

congelamento rapido nonché un rapido processo di sublimazione e scongelamento, riducendo così i danni cellulari imputabili alla ricristallizzazione.

Le misurazioni del volume e della massa del campione, hanno rivelato che la riduzione di questi parametri era più evidente quando il processo di disidratazione avveniva a -25 °C rispetto a -10 °C per 1h. Tale dato era significativamente più elevato utilizzando la soluzione Lyo B, rispetto all'impiego di Lyo A.

Sebbene gli esperimenti del presente lavoro siano stati condotti con campioni con un volume di 80 µl (al fine di mantenere l'accuratezza delle misurazioni) e non 10 µl, il modello sperimentale è lo stesso. Pertanto, i campioni che avevano il più alto volume / riduzione del peso (Lyo B a -25 °C), avevamo il PTM più elevati.

Questi dati ottenuti supportano l'ipotesi che il mantenimento di un processo di sublimazione ad una temperatura alta sottozero si tradurrà in danni ridotti durante la fase di ricristallizzazione con valori di PTM più elevati.

La rapida riduzione del volume delle gocce di seme di ariete ha esposto le cellule spermatiche a uno stress osmotico eccessivo. Quando i campioni sono stati liofilizzati per 10 minuti, è stato rimosso circa il 15% del contenuto di acqua. Questo periodo è stato sufficiente per evitare la ricristallizzazione di un terzo e per mantenere la frazione dell'area sottoposta al congelamento.

Come riportato da altri autori l'eccessiva disidratazione causa un danno effetto-soluzione, nonché una denaturazione macromolecolare e una riduzione di volume delle cellule, che può portare al collasso irreversibile della membrana cellulare (Hara et

al., 2013). Un ulteriore effetto dannoso è rappresentato dallo stress meccanico causato dalla formazione di ghiaccio attorno alle cellule, che costringe le cellule in uno spazio estremamente limitato: quello della soluzione non congelata ( Watson et al., 1988)

Questo è un primo studio mirato alla liofilizzazione del materiale seminale di ariete, che mantiene elevati valori di motilità dopo la reidratazione impiegando un nuovo dispositivo come **Darya**. Tale apparecchiatura, consente una sublimazione rapida ad alte temperature sotto lo zero, che combinata all'azione di soluzioni di crioprotettori a basi di zuccheri come il Trealosio e il Sorbitolo, causano ridotti effetti osmotici e facilita la disidratazione del campione. Tale strategia, potrebbe rappresentare un sistema vantaggioso da impiegare sul materiale seminale di altre specie animali e anche in altri tipi cellulari.

## **4 Esperimento 2: Vitrificazione di tessuto testicolare di ovino prepubere con l'utilizzo del micro-device "E.Vit"**

### **4.1 Introduzione**

Uno degli scopi, nell'ambito delle biotecnologie della riproduzione, è la crioconservazione del liquido seminale e degli spermatozoi

35

Stefano Mario Nieddu, *Metodologie innovative per la crioconservazione del germoplasma nella specie ovina*, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie: *Riproduzione, Patologia, Allevamento e Benessere animale*, Università degli studi di Sassari

(prelevati a livello epididimario e testicolare), nelle diverse specie animali e nell'uomo. Tra i vari fattori clinici, di rilevante importanza è la lotta all'infertilità maschile, che nell'uomo interessa il 7% degli individui ed è sempre di più diffusa nei giovani. Rispetto al passato, oggi è stato dimostrato come in 1 caso su 2, la difficoltà ad ottenere una gravidanza possa dipendere anche da problemi riproduttivi maschili.

Le cause dell'infertilità sono imputabili ad una insufficiente produzione di spermatozoi o ad anomalie del materiale seminale come la ridotta motilità, alterata morfologia, danneggiamenti del DNA.

Diversi sono i fattori che portano all'infertilità maschile, tra questi ricordiamo:

- *Cause genetiche*: ridotta produzione degli spermatozoi generalmente per sviluppo imperfetto dei testicoli (predisposizione genetica associata all'esposizione a fattori ambientali tossici);
- *Criptorchidismo*: mancata discesa dei testicoli nella loro sede (i testicoli conservano una funzionalità ridotta);
- *Infezioni uro-seminali*: infiammazioni e patologie infettive delle vie seminali possono danneggiare gli spermatozoi, i canali seminali, e tutte le ghiandole annesse, (presenza di microrganismi e globuli bianchi);
- *Epididimite*: è un'infiammazione acuta o cronica dell'epididimo,
- *Varicocele*: dilatazione delle vene testicolari (può danneggiare il DNA degli spermatozoi);



- *Anticorpi antispermatozoi*: la loro presenza riduce la capacità fecondante degli spermatozoi e può ostacolarne il transito nelle vie genitali femminili;
- *Malattie sessualmente trasmissibili*: Papillomavirus, Sifilide, Gonorrea, Clamidia;
- *Farmaci: antitumorali*;
- *Chirurgia*: i trattamenti chirurgici dell'apparato genito-urinario, delle ernie inguinali oppure quelli demolitivi in seguito a neoplasie;
- *Traumi*: traumi e torsioni testicolari;
- *Rischi ambientali*: pesticidi, solventi, materie plastiche, vernici, radiazioni elettromagnetiche, metalli pesanti.

Al fine di limitare l'insufficienza gonadica e la sterilità la crioconservazione del tessuto testicolare (TT) rappresenta un'opzione per preservare la fertilità quando altre tecniche come la crioconservazione del materiale seminale non sono possibili o applicabili.

Dato il numero limitato di cellule staminali spermatogeniche (SSC) nei testicoli, un protocollo di crioconservazione ottimale rappresenterebbe è un prerequisito per l'applicazione clinica di una strategia per il ripristino della fertilità. Un recente studio effettuato su 23 campioni di spermatozoi provenienti da un bio-banca francese, ha evidenziato la presenza di notevoli variazioni nelle pratiche mediche che coinvolgono giovani pazienti che cercano di preservare la loro fertilità prima di una terapia oncologica. Tali dati hanno dimostrato come nuove strategie in grado di preservare la fertilità, come la crioconservazione di TT immaturo, siano ancora

poco utilizzate e come il banking delle cellule germinali non sia ancora impiegato in ambito pediatrico (Onofre J. Et al 2016).

Negli ultimi trent'anni, la diagnosi precoce e il miglioramento delle terapie anti-tumorali hanno reso curabili diverse forme di tumori considerate fatali nel passato. C'è stato quindi un progressivo aumento nella sopravvivenza dei pazienti oncologici, che tuttavia sono spesso sottoposti a terapie particolarmente aggressive che possono portare a una sterilità totale o parziale. La ricerca di un metodo valido per ripristinare la loro funzionalità riproduttiva dopo il recupero dalla patologia è quindi altamente auspicabile. Esistono diverse opzioni per la preservazione della fertilità per i pazienti maschi sottoposti a terapie gonadotossiche; la soluzione più semplice è la crioconservazione del materiale seminale, che rappresenta una possibilità concreta di un futuro concepimento. Sfortunatamente, tale possibilità non esiste per i pazienti pre-adolescenti, a causa della incompleta maturità delle loro gonadi.

In questi casi, la crioconservazione del tessuto testicolare è la strategia alternativa più vantaggiosa per preservare la fertilità. Conservare porzioni di tessuto invece che singole cellule testicolari in vista di un possibile futuro re-innesto è un'opzione per consentire il riavvio della funzione riproduttiva una volta concluso il trattamento (Unni et al, 2012). Tuttavia, tale approccio sperimentale non è ancora standardizzato, e sono necessari ulteriori studi per ottimizzare i protocolli e migliorare le condizioni e la vitalità del tessuto post-crioconservazione. Gli studi condotti su diverse specie di mammiferi hanno fornito risultati incoraggianti, e confermano la validità dell'approccio; tuttavia, la degenerazione del tessuto

testicolare dopo crioconservazione e coltura non è stata trascurabile.

Capire i meccanismi molecolari coinvolti nella risposta alla crioconservazione può essere utile per ottimizzare tali tecniche.

È ormai ampiamente dimostrato che lo studio dell'espressione genica rappresenta uno strumento idoneo ad ottenere informazioni sulla cellula, sull'efficacia dei trattamenti farmacologici e sui potenziali effetti della manipolazione *in vitro*. La regolazione dell'espressione genica rappresenta la prima risposta della cellula allo stress esterno e ai cambiamenti nell'omeostasi.

L'entità e il tipo di stress possono causare risposte molecolari diverse, coinvolgendo un numero variabile di geni e alterando la loro trascrizione in tempi e modi differenti. Maggiore è l'insulto maggiore sarà il numero di geni necessari affinché la cellula risponda appropriatamente allo stimolo.

Lo studio del trascrittoma può essere fatto con diversi approcci sperimentali. Principalmente, si possono distinguere due tipi di analisi: a) lo studio dell'intero trascrittoma di una cellula in un dato momento, b) lo studio di un sottoinsieme di geni. Il primo caso può essere fatto utilizzando tecnologie costose, come i microarrays o la tecnica di sequenziamento dell'RNA (Real Time PCR). Questo approccio consente di ottenere informazioni importanti con un investimento minore ed è stato dimostrato che l'analisi di un pannello di un numero adeguato di geni è generalmente rappresentativo dello stato di perturbazione del trascrittoma (Wrenzycki et al., 1999, 2001 ; Wrenzycki et al., 2003; Rizos et al., 2002). Pertanto, lo stato di espressione di specifici trascritti può

essere considerato un indice dello stato generale dell'espressione genica e quindi un parametro di valutazione della qualità e dello stato cellulare. Quando l'espressione di specifici geni è coerentemente associata ad alterazioni dello stato cellulare, possono essere considerati marcatori molecolari per la valutazione della risposta della cellula a stress specifici.

Numerosi studi hanno dimostrato come la crioconservazione possa determinare una modifica dei profili di espressione genica della cellula (Liu et al., 2003; Lee et al., 2008; Succu et al., 2008). I dati riportati in bibliografia hanno mostrato come la crioconservazione altera l'espressione dei geni coinvolti nello stress ossidativo, nella regolazione dell'apoptosi e nella regolazione del ciclo cellulare (Succu et al., 2008; Anchamparuthy et al., 2010; Habibi et al., 2010; Turathum et al., 2010; Chamayou et al., 2011).

## **4.2 Scopo**

Lo scopo del secondo esperimento della tesi è stato quello di valutare l'efficienza di crioconservazione di tessuto testicolare di ovino prepubere vitrificato con il nuovo micro-device "E.Vit". La reazione cellulare alla crioconservazione in termini di vitalità e l'espressione di un pannello di geni è stata analizzata immediatamente dopo lo scongelamento e durante le 24 ore successive.

## 4.3 Materiali e metodi

### 4.3.1 Disegno sperimentale

Il tessuto testicolare è stato prelevato da agnelli (n=10) regolarmente macellati e sottoposto a crioconservazione tramite vitrificazione con l'utilizzo del nuovo micro-device "E.Vit". Dopo lo scongelamento, il tessuto è stato coltivato *in vitro* e valutato in termini di vitalità ed espressione di un pannello di nove geni. Per distinguere i potenziali effetti specifici legati alla crioconservazione e/o alla coltura *in vitro* post-scongelamento, sono stati creati i seguenti gruppi sperimentali:

- COh (n=10): tessuto testicolare analizzato immediatamente dopo la dissezione.
- C2h (n=10): tessuto testicolare analizzato dopo due ore di coltura *in vitro* (post-dissezione)
- C24h (n=10): tessuto testicolare analizzato dopo 24 ore di coltura *in vitro* (post-dissezione)
- F2h (n=10): tessuto testicolare soggetto a vitrificazione e due ore di coltura *in vitro* (post-scongelamento)
- F24h (n=10): tessuto testicolare soggetto a vitrificazione e 24 ore di coltura *in vitro* (post-scongelamento)

Tutti i gruppi sperimentali sono stati sottoposti a valutazione della vitalità cellulare e dell'espressione di un pannello di geni.

### 4.3.2 Raccolta e preparazione campioni

I testicoli sono stati recuperati da agnelli di età compresa tra i due e i quattro mesi, regolarmente macellati presso strutture autorizzate. Sono stati posti immediatamente in una soluzione salina bilanciata “Dulbecco saline phosphate buffer” (PBS) con penicillina (50 mg/ml) e streptomicina (50 mg/ml) alla temperatura di 4°C, e trasportati in laboratorio entro 2 ore dal prelievo. Si è quindi proceduto immediatamente alla dissezione dei testicoli, che sono stati privati della tunica albuginea, lavati due volte in PBS e trasferiti nel Medium di Dissezione [TCM-199 con 25 mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethansulfonic Acid (HEPES), 50 IU/ml streptomicina e 50 IU/ml penicillina, 0.005 M NaHCO<sub>3</sub> e alcol polivinilico (PVA) 0.1% (w/v)] a pH 7.22 ± 0.1 e 4°C. I testicoli sono stati sezionati sagittalmente con una lama di bisturi sterile, esponendo il parenchima, e sezioni di 1 mm<sup>3</sup> sono state prelevate.

Le sezioni sono quindi state processate ulteriormente come segue:

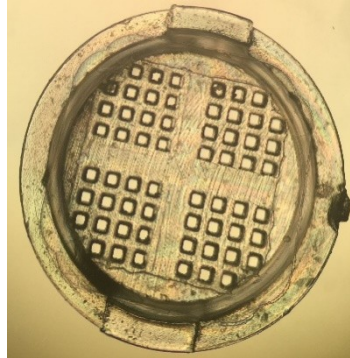
- Sottoposte a immediata vitrificazione
- Poste in 300 µl di RNAlater™ Stabilization Solution (ThermoFisher Scientific) e conservate a -80°C sino al successivo procedimento per l’analisi dell’espressione genica.
- Coltivate in vitro per 2 e 24 ore.

### **4.3.3 Vitrificazione e ripristino della temperatura**

#### **- Vitrificazione**

Il device “E.Vit” (FertilSafe LTD) utilizzato per la vitrificazione è costituito da una paillette di 0.3 mm di diametro, con una griglia di policarbonato con pori di 50 µm applicata ad una delle due estremità aperte (Figure 1). Tale micro-strumento permette che tutte le procedure di crioconservazione siano effettuate al suo interno:

permette la fuoriuscita della soluzione di crioconservazione in eccesso, ma non del campione, e crea un sottile film di soluzione di vitrificazione intorno al tessuto.



**Figura 5:** Immagine al microscopio (4X) del dispositivo E-Vit (FertilSafe LTD)

I campioni sono stati inseriti all'interno della paillette (3 sezioni da  $1 \text{ mm}^3$  in ognuna) con l'aiuto di una siringa, e la microgriglia è stata posizionata ad una estremità aperta. I campioni sono stati poi esposti alla soluzione di equilibratura [(ES) TCM-199 + HEPES 1M, Glicole etilenico (EG) 8%, Dimetilsolfossido (DMSO) 8%, Albumina sierica bovina (BSA) 0.6%] e di vitrificazione [(VS): TCM-199 + HEPES 1M, EG 18%, DMSO 18%, BSA 0.6% e Trealosio 0.5 M], seguendo un protocollo in due fasi (two-step vitrification protocol).

I campioni sono stati posti inizialmente in  $100 \mu\text{l}$  di soluzione di equilibratura per 5 minuti, poi in  $300 \mu\text{l}$  di soluzione di vitrificazione per ulteriori 5 minuti. La VS è stata eliminata e la paillette immediatamente immersa in azoto liquido (Figura 2).



**Figura 6:** Contenitore di azoto liquido per la conservazione dei campioni.

#### - **Ripristino della temperatura**

La temperatura è stata ripristinata immergendo il micro-device in una soluzione di TCM-199 con 20% di FCS e saccarosio a concentrazioni decrescenti (1M, 0.5 M e 0.25 M). I campioni sono stati tenuti in ogni soluzione per 5 minuti a 37°C, poi rimossi dalla paillette e posti in medium di coltura (TCM-199 con 20% FCS) per essere coltivati in vitro per 2 o 24 ore. Dopo la coltura in vitro, le sezioni di tessuto sono state conservate in RNAlater a -80°C sino ad ulteriore procedimento.

#### **4.3.4 Coltura in vitro**

Le sezioni tissutali sottoposte a vitrificazione e ripristino della temperatura sono state coltivate in vitro in piastre 35X10 mm con 2 ml di medium di coltura a 38.5°C e CO<sub>2</sub> al 5.5% in atmosfera umidificata.



#### 4.3.5 Valutazione della vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata tramite colorazione con Trypan Blue. Le sezioni tessutali di 1 mm<sup>3</sup> in medium di dissezione sono state frammentate meccanicamente con una microlama e ulteriormente disgregate tramite aspirazione con pipetta da 1 ml, per ottenere cellule isolate e frammenti di tubuli.

Cinque ml di sospensione cellulare sono stati trasferiti in un tubo da 15 ml, a cui sono stati aggiunti 0.5 ml di FSC (concentrazione finale 10%), e lasciati ad incubare a per 30 minuti per ristabilire l'omeostasi. Quaranta µl di tale sospensione cellulare sono stati trasferiti in tubi da 0.5 ml e colorati con 8 µl di Trypan Blue (soluzione 0.4%; Sigma-Aldrich). Dopo due minuti di incubazione, la colorazione è stata bloccata tramite aggiunta di 200 µl di medium di dissezione. Dieci µl di soluzione sono stati posti sopra un vetrino e osservati tramite microscopio ottico invertito (Olympus IX70) ad ingrandimento 40X. La vitalità è stata espressa come numero di cellule vive su 100 cellule.

#### 4.3.6 Isolamento dell'RNA e trascrizione inversa

I campioni di tessuto per l'analisi molecolare sono stati conservati in RNAlater a -80°C sino al momento dell'isolamento dell'RNA.

L'RNA totale è stato isolato con il TRIzol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA; 1 ml/50 mg tessuto) seguendo le istruzioni del produttore, e trattato con DNase I (Invitrogen Corporation). La qualità e la quantità dell'RNA isolato sono state valutate tramite spettrofotometro NanoDropLite (Fisher Scientific S.A.S., Illkirch

Cedex, France), mentre l'integrità è stata visualizzata tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1% in buffer EDTA Tris Borato. Cinquecento nanogrammi di RNA totale per ogni campione sono stati retro trascritti in una reazione di 20 µl contenente with 50 mM Tris HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM dNTPs, 2,5 µM primers random esameri, 20 U di RNaseOUT™, e 100 U di enzima SuperScript™ III RT (tutti forniti dalla Invitrogen Corporation). Un controllo negativo (senza enzima) è stato incluso per confermare l'assenza di contaminazione con DNA genomico. I tubi sono stati tenuti per 10 minuti a 25°C, 1 ora a 42°C e 15 minuti a 70°C per inattivare la reazione.

#### **4.3.7 Real time-polymerase chain reaction**

La quantificazione relative dei trascritti è stata effettuata tramite Real Time PCR in uno strumento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Singapore). La reazione è stata effettuata in un volume di 15 µl contenente 7,5 µl 2× SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM di ogni primer (Tabella 1) e cDNA equivalente a circa 50 ng di RNA.



**Figura 7:** StepOne™ Real-Time PCR System.

Il protocollo di PCR prevedeva due fasi di incubazione (50°C per 10 minuti e 95°C per 2 minuti) seguite da 40 cicli di amplificazione (95°C per 15s e la temperatura di annealing specifica per ogni primer per 30s), ed un programma di melting (65–95°C, con inizio dell'acquisizione della fluorescenza a 65°C e rilevazioni ogni 10s, sino alla temperatura di 95°C), infine una fase di raffreddamento a 4°C. Per limitare le variazioni dovute all'operatore, tutti i campioni sono stati analizzati nella stessa piastra, con una miscela di reazione contenente tutti i reagenti a parte i campioni. La specificità dei prodotti di PCR è stata verificata tramite analisi della melting curve. Per ogni coppia di primers, l'efficienza della reazione di PCR è stata determinata tramite costruzione di una curva standard con una serie di diluizioni note che coprisse almeno tre ordini di grandezza. Solo i primers con efficienza di reazione compresa tra 90 e 110 % (coefficiente angolare compreso tra 3.1 e 3.6) e un

coefficiente di determinazione  $r^2 > 0.99$  sono stati utilizzati per l'analisi.

L'espressione dei geni target è stata normalizzata contro la media geometrica di tre geni housekeeping: ribosomal protein L19 (*RPL19*), tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta (*YWHAZ*) e succinate dehydrogenase complex flavoprotein, subunit A (*SDHA*).

Symbol	Gene name	Accession number	Primer sequence	Temp	bps
<i>AR</i>	Androgen receptor	KF227907	5' atgtcctggaagccattgag 3' 5' caaacaccataagcccatc 3'	60°C	219
<i>BAX</i>	BCL2-associated X Protein	XM_004015363	5' aacatggagctgcagaggat 3' 5' ggacattggacttctcga 3'	58°C	219
<i>CIRBP</i>	Cold inducible RNA binding protein	XM_004008776	5' gagggctgagtttgacacc 3' 5' atgggaagtctgtggatggg 3'	58°C	190
<i>FSHR</i>	follicle stimulating hormone receptor	NM_001009289	5' agtcttctctgccaggaca 3' 5' cttctgggatgactcgaagc 3'	60°C	107
<i>HSP90b</i>	Heat shock protein 90b	XM_004018854	5' tggagatcaaccctgacca 3' 5' gggatcctcaagcgagaag 3'	58°C	143
<i>KIFF11</i>	Kinesin family member 11	XM_004020034	5' tgatcttcagggcagtgaga 3' 5' ccctcttactctgggaagg 3'	62°C	100
<i>POU5F1 (OCT4)</i>	POU domain, class 5, transcription factor 1	XM_012101009	5' gaggagtcccaggacatcaa 3' 5' ccgagcttacacatgttct 3'	56°C	204
<i>RLP19</i>	ribosomal protein L9	XM_004012836	5' caactcccgccagcagat 3' 5' ccgggaatggacagtcaca 3'	56°C	127
<i>SDHA</i>	Succinate Dehydrogenase	XM_012125144	5' catccactacatgacggagca 3' 5' atcttgccatcttcagtctgcta 3'	60°C	90
<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1	NM_001145185	5' ggcaatgtgaaggctgacaa 3' 5' aagaccagatgacttgggca 3'	58°C	130
<i>TERT</i>	telomerase reverse transcriptase catalytic subunit	EU139125	5' ggagaccacgttcagaaga 3' 5' gcctgacctctgcttctgac 3'	60°C	131
<i>YWHAZ</i>	tyrosine 3- Monooxygenase	NM_001267887	5' ttaggagcccgtaggtcatct 3' 5' ttctctgtattctcgagccatct 3'	60°C	168

**Tabella 7 :** Primers utilizzati per gli esperimenti di Real-time PCR.

#### 4.4 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con il programma MINITAB Release 12.1 (Minitab, Inc., State College, PA, USA). I dati di vitalità cellulare sono stati analizzati tramite analisi della varianza (ANOVA) seguita da confronti multipli tramite Tukey's *post-hoc* test.

Dopo aver verificato la normalità della distribuzione dei dati di espressione genica tramite il test Kolmogorov-Smirnov, questi sono stati analizzati con il General Linear Model ANOVA, seguita da confronti multipli tramite Tukey's *post-hoc* test. Le differenze osservate sono state considerate significative quando  $p < 0.05$ .

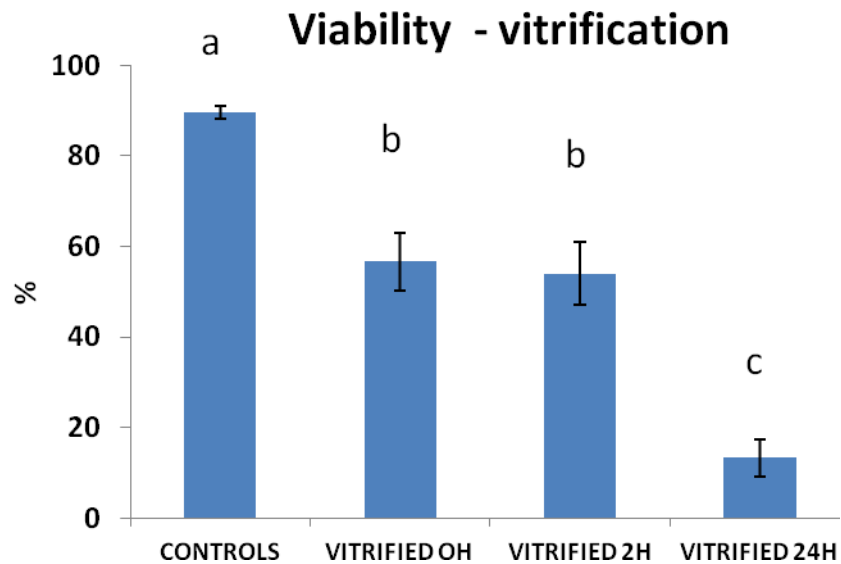
#### 4.5 Risultati

##### 4.5.1 Vitalità cellulare

Le percentuali medie di vitalità ( $n=3$  per gruppo sperimentale) sono stati valutati tramite la colorazione con Trypan Blue. I risultati sono riassunti nella Tabella 8. La vitrificazione è influito significativamente sulla vitalità cellulare, che si è significativamente ridotta da  $89.67\% \pm 1.45$  nei controlli non crioconservati a  $56.67\% \pm 6.33$  immediatamente dopo il ripristino della temperatura (Vitrificati 0h) e  $54\% \pm 7$  e  $13.33\% \pm 4.1$  dopo 2 e 24 ore di coltura in vitro post-scongelo, rispettivamente.

Categorie	Vitalità (mean $\pm$ SE)
Controllo	$89.67\% \pm 1.45$
Vitrificati 0h	$56.67\% \pm 6.33$
Vitrificati 2h	$54\% \pm 7$
Vitrificati 24h	$13.33\% \pm 4.1$

**Tabella 8:** Vitalità cellulare dopo colorazione con Trypan Blue.



**Figura 8:** Vitalità cellulare dopo vitrificazione di tessuto testicolare e ripristino della temperatura. Controlli: tessuto testicolare analizzato immediatamente dopo il dissezionamento. *Vitrified 0h*: tessuto testicolare vitrificato e analizzato immediatamente dopo il ripristino della temperatura. *Vitrified 2h*: tessuto testicolare vitrificato e analizzato dopo 2 ore di coltura in vitro dopo il ripristino della temperatura. *Vitrified 24h*: tessuto testicolare vitrificato e analizzato dopo 24 ore di coltura in vitro dopo il ripristino della temperatura.

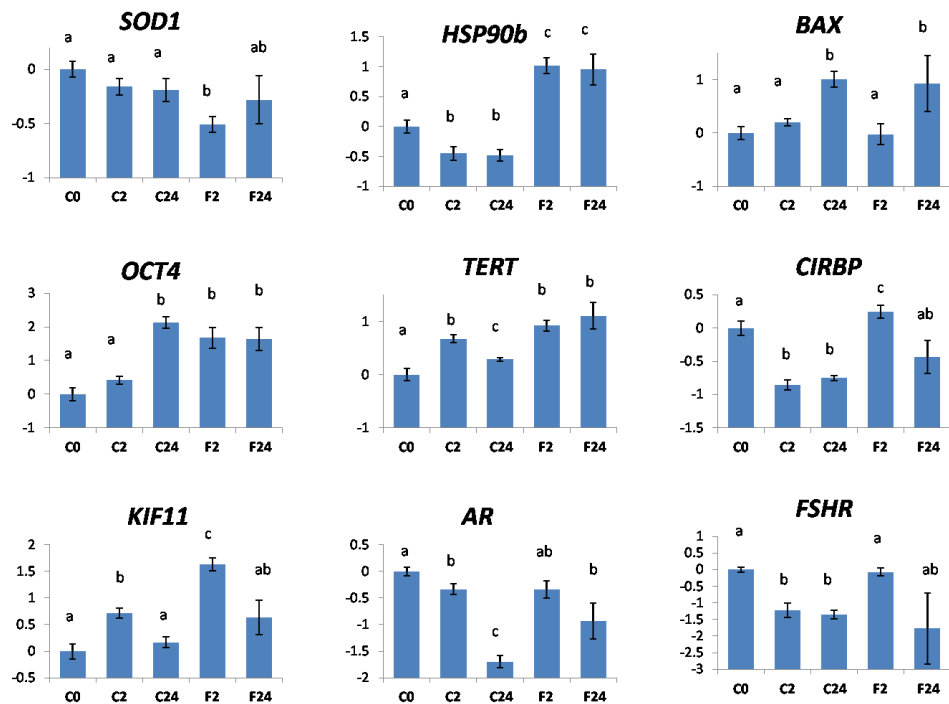
#### 4.5.2 Espressione genica

La quantificazione relativa dei trascritti è descritta nella Figura 9. L'espressione di tutti i geni è stata osservata nel tessuto testicolare ed è stata significativamente influenzata o dalla crioconservazione e/o dalla coltura in vitro post-scongelo.

L'abbondanza di *SOD1* non è variata in seguito alla coltura in vitro, ma è significativamente diminuita dopo la vitrificazione nei

campioni F2. La coltura in vitro ha causato la diminuzione dell'espressione di HSP90b, mentre la vitrificazione ha portato ad un relativo aumento dei livelli dei trascritti sia dopo 2 che 24 ore di coltura post-warming. L'espressione di *BAX* è aumentata dopo 24 ore di coltura in vitro, sia nel caso dei campioni vitrificati (F24) che nei controlli (C24). Un aumento dei trascritti di *OCT4* è stato osservato nei campioni vitrificati (F2 e F24) e nei controlli coltivati in vitro per 24 ore (C24). I livelli degli mRNA di *TERT* si è innalzato in tutti i gruppi sperimentali, rispetto al controllo, anche se in diversa misura. Al contrario, l'espressione di *CIRBP* è diminuita in seguito a coltura in vitro (C2 e C24), è aumentata subito dopo la vitrificazione (V2), ma è tornata a livelli simili al controllo dopo 24 di coltura post-scongelo (F24). L'espressione di *KIF11* è aumentata transitoriamente nei campioni F2 e C2, ed è tornato a livelli basali dopo 24 ore (F24 e C24). L'espressione dei recettori degli androgeni (*AR*) e FSH (*FSHR*) è diminuita in seguito alla coltura in vitro (C2 e C24), mentre sembra non essere influenzata dalla vitrificazione (F2 e F24).





**Figura 9:** Espressione relativa di *SOD1*, *HSP90b*, *BAX*, *OCT4*, *TERT*, *CIRBP*, *KIF11*, *AR* e *FSHR* nel tessuto testicolare soggetto a vitrificazione e coltura in vitro per 2 (F2) o 24 ore post ripristino della temperatura (F24).

I relativi controlli sono costituiti da tessuto testicolare non crioconservato analizzato immediatamente (C0) o dopo coltura in vitro per 2 (C2) o 24 ore (C24).

I valori sono espressi come  $\Delta Cq$  e indicano il valore medio  $\pm$  SEM di 10 replicati, normalizzati contro la media geometrica di tre geni housekeeping (RPL19, YWHAZ and SDHA).

## 4.6 Discussione

Nel presente studio, abbiamo valutato l'efficacia della vitrificazione del tessuto testicolare di ovino prepubere con un nuovo microdispositivo denominato "e.Vit", recentemente progettato per consentire l'esecuzione di tutte le procedure di crioconservazione all'interno di una paillette (Arav et al, 2018). Il sistema offre vantaggi significativi, garantendo un metodo rapido e

standardizzato che riduce al minimo gli errori di manipolazione dell'operatore. I micropori della griglia della dimensione di 50µm consentono di espellere quasi completamente l'eccesso dei crioprotettori, riducendo significativamente il rischio di tossicità cellulare. I risultati del presente lavoro confermano la validità del dispositivo. Nonostante il tessuto testicolare di prepubere sia piuttosto suscettibile allo stress derivato dalla manipolazione in vitro rispetto al tessuto adulto (Unni et al, 2012), le sezioni di tessuto immaturo sono state crioconservate con successo. Come previsto, la vitalità cellulare nei campioni crioconservati è significativamente diminuita rispetto al controllo fresco, ma la maggior parte delle cellule è sopravvissuta alla vitrificazione, sia immediatamente che a 2 ore dal ripristino della temperatura. Tuttavia, l'estensione della coltura in vitro fino a 24 ore ha ridotto notevolmente la vitalità delle cellule, che hanno mostrato evidenti segni di sofferenza e lisi. Tale diminuzione della vitalità indica possibili deficienze nelle tecniche di coltura post-congelamento. Oltre alla vitalità cellulare, abbiamo indagato sui meccanismi molecolari potenzialmente interessati dalla vitrificazione, analizzando l'espressione di un pannello di 9 geni coinvolti in diverse funzioni cellulari. L'analisi ha considerato la reazione alla crioconservazione durante un periodo di 24 ore di coltura *in vitro* dopo lo scongelamento. In accordo con quanto osservato per la vitalità cellulare, l'espressione di *BAX*, che codifica per una proteina proapoptotica ed è indicativa di stress cellulare, non è variata nei campioni sottoposti a crioconservazione e nei controlli coltivati in vitro per due ore, mentre è aumentata dopo 24 ore di coltura in vitro (Figura 9). Tale pattern di espressione suggerisce che le cellule

siano in grado di superare la crioconservazione ed un tempo breve di coltura in vitro, dopo il quale mostrano segni di sofferenza.

Diversamente, i pattern di espressione di *HSP90b* separano chiaramente i tessuti crioconservati dai controlli: mentre la coltura in vitro causa una riduzione dell'espressione di *HSP90b*, la vitrificazione ne provoca un significativo aumento che si verifica immediatamente dopo il ripristino della temperatura e persiste fino alla 24<sup>a</sup> ora. Tale comportamento suggerisce che le cellule non si siano completamente ristabilite dagli effetti della crioconservazione anche dopo 24 ore di coltura.

Il gene *SOD1* codifica per la super ossido dismutasi, enzima responsabile della distruzione dei radicali liberi superossidi tramite conversione in ossigeno molecolare e perossido di idrogeno. L'azione antiossidante dell'enzima è fondamentale per prevenire il dannoso accumulo di radicali liberi nella cellula. I livelli di *SOD1* osservati nei tessuti sottoposti a IVC e crioconservazione non indicano la presenza di un particolare stress ossidativo; la variazione osservata nei tessuti vitrificati due ore post-ripristino della temperatura, infatti, scompare nei campioni vitrificati sottoposti a 24h di IVC, suggerendo una normalizzazione dei livelli di stress ossidativo entro i tempi di osservazione.

*TERT* codifica per la subunità catalitica dell'enzima telomerasi (Meyerson et al, 1997), una ribonucleoproteina che previene l'accorciamento dei telomeri ad ogni divisione cellulare (Greider and Blackburn, 1985;). La sua azione è fondamentale nelle cellule germinali, per garantire il trasferimento di cromosomi con telomeri intatti durante la riproduzione. Durante la spermatogenesi si osserva un'alta attività dell'enzima telomerasi negli spermatogoni (Kim et al, 1994), che diminuisce gradualmente durante la differenziazione

sino a cessare completamente negli spermatozoi maturi (Eisenhauer et al, 1997). Il pattern di espressione di *TERT* osservato nel nostro esperimento suggerisce che le cellule sottoposte a crioconservazione e/o coltura *in vitro* abbiano mantenuto vitalità e capacità di dividersi. Infatti, i livelli di mRNA sono significativamente più elevati in tutti i gruppi trattati, rispetto al controllo, suggerendo la presenza di cellule germinali in attiva divisione durante l'intero periodo di tempo analizzato.

Anche i pattern di espressione del gene *CIRBP* suggeriscono l'efficacia del protocollo di vitrificazione proposto nel presente lavoro. Il gene infatti codifica per una proteina legante l'RNA che si esprime in risposta a variazioni della temperatura, in particolare nei casi di lesioni dovute a shock da freddo (Youm et al, 2017). Come ci si attendeva, l'espressione di *CIRBP* ha mostrato un aumento esclusivamente nei campioni sottoposti a crioconservazione (F2), ma è tornata a livelli simili ai controlli freschi dopo 24 ore di IVC, suggerendo che le cellule abbiano mantenuto la capacità di reagire alla crioconservazione.

In conclusione, la presente ricerca ha mostrato un protocollo di vitrificazione di successo per preservare il tessuto testicolare di ovino prepubere. Sia la vitalità cellulare post scongelamento che l'analisi dell'espressione genica hanno infatti dimostrato che le cellule sono in grado di tollerare lo stress dovuto alla crioconservazione e di sopravvivere per il periodo di 24 ore analizzato dopo il ripristino della temperatura. Tuttavia, i risultati suggeriscono di limitare la coltura post-scongelamento a poche ore. Il nuovo approccio per la crioconservazione del tessuto testicolare di soggetti prepuberi è una strategia promettente per la conservazione della fertilità e potrebbe contribuire allo sviluppo di

un programma di biodiversità su larga scala. Il lavoro è rilevante per l'uso clinico dei tessuti conservati e contribuisce all'ottimizzazione delle tecnologie di conservazione della fertilità nei mammiferi, compreso l'uomo.

## **5 ESPERIMENTO 3: APPLICAZIONE DI NUOVE METODICHE PER LA VITRIFICAZIONE DEGLI EMBRIONI DI OVINO**

### **5.1 Introduzione**

La crioconservazione è una tecnica che consente di preservare e conservare nel tempo il germoplasma delle diverse specie animali e dell'uomo a una temperatura di tipicamente  $-197^{\circ}\text{C}$  usando  $-197^{\circ}$

57

Stefano Mario Nieddu, *Metodologie innovative per la crioconservazione del germoplasma nella specie ovina*, Tesi di dottorato in Scienze Veterinarie: *Riproduzione, Patologia, Allevamento e Benessere animale*, Università degli studi di Sassari

C in azoto liquido .. A queste temperature, enzimi o processi chimici che potrebbero causare danni alle cellule sono definitivamente bloccati A temperature così basse, infatti qualsiasi(Sambu S., 2015).

Nell'arco degli anni la sua evoluzione ha contribuito a migliorare notevolmente l'efficienza delle tecniche di riproduzione assistita (ARTs), che trovano impiego sia in campo umano che in campo veterinario.

I vantaggi della crioconservazione dei gameti, degli embrioni e del tessuto ovarico in campo umano sono molteplici poiché questa tecnica rappresenta un fondamentale strumento per la gestione dell'ipofertilità e delle turbe riproduttive maschili e femminili.

Altresì, la possibilità di crioconservare gli oociti è una valida alternativa al congelamento degli embrioni ed evita alla donna di doversi sottoporre a più cicli di stimolazione ovarica, aumentando le possibilità di intraprendere una gravidanza e allo stesso tempo superare i problemi di natura etica legati a una sovra-produzione di embrioni. Questa tecnica permette inoltre di tutelare la fertilità in soggetti con storia familiare di menopausa precoce e l'allestimento di banche dei programmi di ovodonazione delle unità di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA).

In campo veterinario, la crioconservazione, già dal secolo scorso, rappresenta uno strumento di fondamentale importanza dal punto di vista zootecnico per il miglioramento dell'efficienza riproduttiva degli animali e l'accelerazione della selezione genetica,

permettendo la diffusione di genotipi selezionati in tempi ridotti e per lunghe distanze.

È stato infatti possibile costituire dei centri di raccolta con vere e proprie banche del seme che permettono il suo utilizzo a breve, medio e lungo termine e garantiscono l'introduzione della diversità genetica in popolazioni *in vivo* riducendo i livelli di inbreeding (Sonesson et al., 2002).

Inoltre il germoplasma maschile crioconservato può essere facilmente trasportato in paesi diversi da quello del centro di raccolta, superando tutti i problemi sanitari (trasmissione delle malattie) e di benessere animale legati alla movimentazione di animali vivi.

Inoltre, al fine di preservare la biodiversità animale, la crioconservazione trova largo utilizzo nel recupero e salvaguardia di specie selvatiche in via di estinzione o a ridotta consistenza numerica (Comizzoli et al., 2014). Negli ultimi anni, programmi di conservazione delle risorse genetiche di queste specie animali hanno focalizzato il loro interesse sulla crioconservazione di gameti, embrioni e gonadi con la costituzione di apposite banche, permettendo effettivamente l'utilizzo di materiale genetico di animali non più in vita (Mara et. al, 2013).

Nel caso degli embrioni è possibile creare delle banche di embrioni con sesso predeterminato ed esenti da particolari patologie infettive.

Tali tecniche rendono possibile anche la conservazione del tessuto ovarico e quindi dei follicoli primordiali, con successivo trapianto o coltura *in vitro*, con il fine di produrre oociti maturi capaci di essere

fertilizzati e infine trasferiti in animali riceventi (Santos et al., 2010).

Il campo della crioconservazione è in continua evoluzione poiché, sebbene siano stati fatti enormi passi avanti, soprattutto in campo umano, ulteriori studi sono necessari per sfruttare al meglio tali tecnologie e per standardizzare i protocolli. Infatti, la sopravvivenza alla crioconservazione varia in base al tipo cellulare preservato, alla specie interessata ed al protocollo utilizzato.

Indubbiamente i risultati ottenuti con le tecniche di crioconservazione del materiale seminale sono soddisfacenti sia in campo umano che in campo veterinario. Tuttavia, sebbene il seme congelato venga largamente utilizzato nelle pratiche di inseminazione artificiale routinarie, i protocolli adoperati per preservarlo sono ancora sub-ottimali e necessitano di essere adattati secondo la specie animale.

Anche per quanto riguarda il germoplasma femminile e gli embrioni non è stato ancora trovato un protocollo di crioconservazione che possa essere ritenuto ottimale. Essi vanno infatti incontro a danno sia morfologico che funzionale durante i processi di discesa termica ma i livelli di sopravvivenza e di tassi di sviluppo variano moltissimo in base alla specie, allo stadio di sviluppo e all'origine. Per quanto concerne gli embrioni, il successo di tale tecnica risulta standardizzata in campo umano, al contrario è meno efficiente in ambito veterinario (Cobo et al., 2011).

Negli oociti le procedure di crioconservazione non sono state ancora consolidate per via delle peculiarità strutturali di questa cellula tra cui le sue grandi dimensioni, la composizione della



membrana citoplasmatica, la presenza della zona pellucida e l'alto contenuto di lipidi del suo citoplasma, che la rendono particolarmente suscettibile ai trattamenti ipotermici.

Per questi motivi la ricerca deve continuare a progredire per permettere un'ottimizzazione di tutte le procedure e innalzare così le percentuali di riuscita delle tecniche di crioconservazione che anno dopo anno si stanno rivelando sempre più utili nel campo della riproduzione assistita. Lo scopo di questo esperimento è stato quello di valutare l'efficienza di un nuovo dispositivo per la vitrificazione negli embrioni di ovino crioconservati allo stadio di giovani blastocisti e blastocisti espansa.

Il dispositivo impiegato è costituito da una mini griglia avente dei pori da 50µm applicata a un'estremità libera della straw da 0.25 ml usata come supporto per la vitrificazione. Tale dispositivo così strutturato permette di effettuare tutte le fasi del processo senza dover cambiare la straw o impiegare un altro supporto. Inoltre tale supporto potrebbe prevedere l'impiego di macchinari automatizzati per la vitrificazione, aiutando così a diminuire in modo significativo le percentuali di un eventuale errore umano.

## 5.2 Disegno sperimentale

### - Fase 1.

L'esperimento ha valutato l'efficacia di due differenti metodi di vitrificazione:

- **Sistema dinamico**: 4 passaggi in soluzioni di equilibratura a concentrazioni crescenti di crioprotettori + 2 passaggi in

soluzioni di vitrificazione a concentrazioni crescenti di crioprotettori.

- **Sistema 2 step**: 1 passaggio in soluzione di equilibratura e 1 passaggio in soluzione di vitrificazione.

Sono state comparate due classi differenti di embrioni in base allo stadio di giovane blastocisti (6 gg), blastocisti espansa (7 gg) e percentuali di schiusa dopo il ripristino della temperatura.

## - Fase 2

Valutazione dell'efficacia dei due sistemi dopo il ripristino della temperatura mediante

- a) percentuali di recupero degli embrioni;
- b) riespansione della cavità blastocelica dopo 2h dal ripristino della temperatura;
- c) percentuale di sopravvivenza dopo 24h dal ripristino della temperatura;
- d) percentuali di schiusa dopo 48h dal ripristino della temperatura;
- e) Valutazione della percentuale di apoptosi cellulare con metodica TUNEL.

## 5.3 Materiali e metodi

### 5.3.1 Recupero oociti

Le ovaie sono state prelevate da Pecore adulte di razza Sarda, di età compresa tra i 3 e i 6 anni, in seguito a regolare macellazione nei mattatoi della provincia di Sassari.

Immediatamente dopo il prelievo le ovaie sono state poste in PBS (Dulbecco Phosphate Buffer Saline) addizionato con penicillina e streptomina (50mg/ml) e mantenute ad una temperatura costante di 27-30°C durante il trasporto in laboratorio.

Le ovaie sono state pulite da eventuali residui tissutali, lavate 2 volte in PBS e infine poste nel Medium di Dissezione (MD) a pH 7.22 ±0.1 a 37 °C costituito da TCM-199 con HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazina-N-2-ethansulfonic Acid) 25 mM per stabilizzare il pH, 50 UI/ml di antibiotici (streptomina e penicillina), sodio bicarbonato (NaHCO<sub>3</sub>) 0.005 M e 0.1% (w/v) di alcool polivinilico (PVA). Entro 2 ore dal recupero le ovaie sono state così processate al fine di recuperare i complessi cumulo-oocita (COCs).

Le ovaie sono state divise sagittalmente con l'ausilio di una microlama sterile e con la tecnica dello slicing sono stati liberati i COCs dai follicoli.

### **5.3.2 Maturazione (IVM), fertilizzazione (IVF) e coltura degli embrioni in vitro (IVC).**

Per la maturazione in vitro (IVM), i COCs selezionati, sono stati messi a maturare in 650µl di TCM-199 contenente il 10% di siero di pecora in estro (SPE), 50 UI/ml di antibiotici (Streptomina e

Penicillina), 0.1 UI/ ml di Pluset (FSH + LH) e cisteamina 100  $\mu$ M, all'interno di una four-well Nunc®, per 24 ore a 38.5° C e il 5% di CO<sub>2</sub> in aria atmosferica umidificata.

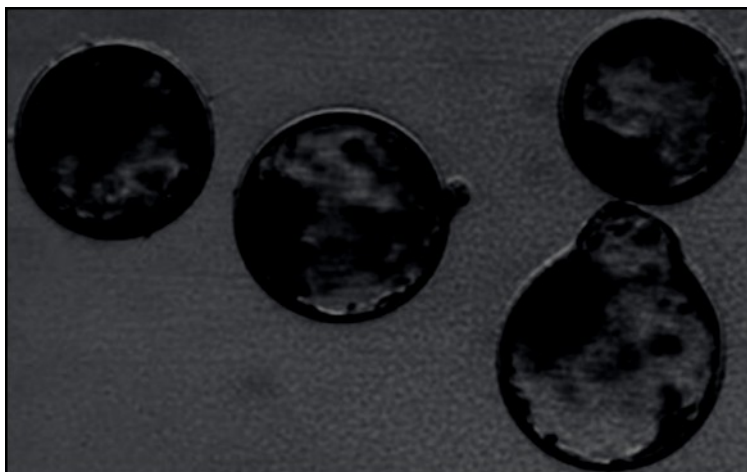
Dopo 24 ore dalla IVM, gli oociti sono stati co-incubati con il seme, per la fertilizzazione *in vitro* (IVF). Per gli esperimenti è stato usato seme fresco di Ariete (razza Sarda) di anni 3, prelevato circa 1-2 ore prima della fertilizzazione tramite vagina artificiale.

Il seme è stato valutato preliminarmente con l'ausilio dello stereomicroscopio (motilità di massa) e del sistema CASA (Ivos, Hamilton Thorne, Biosciences).

Prima della IVF, gli oociti sono stati denudati meccanicamente dalle cellule della granulosa mediante l'ausilio di un capillare di vetro, avente un calibro leggermente più grande degli oociti. Sono stati successivamente posti in Synthetic Oviductal Fluid (SOF; Tervit et al., 1972) con il 2% di SPE, 1  $\mu$ g/mL di Eparina, 1  $\mu$ g/mL Ipotaurina in four-well con il seme fresco ad una concentrazione di circa  $1 \times 10^6$  spermatozoi/mL<sup>-1</sup>, per 22 ore a 38.5 °C al 5% di CO<sub>2</sub> in aria atmosferica umidificata.

Al termine della IVF, i presunti zigoti sono trasferiti e incubati in 650  $\mu$ L di SOF supplemento con BSA (4 mg/mL), penicillina (100 UI/mL) e aminoacidi essenziali (EAA) e non essenziali (NEAA) a concentrazione oviduttale (Walker et al., 1996). A 30 ore post fertilizzazione è stato registrato il numero degli oociti divisi.

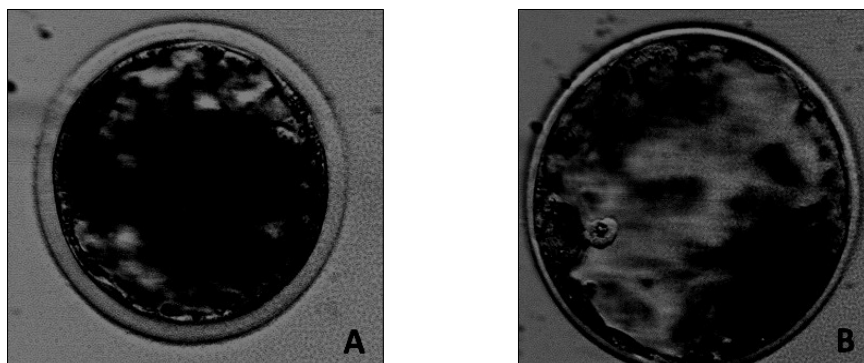
La coltura degli embrioni è stata effettuata a 38.5°C in condizioni controllate al 5% di O<sub>2</sub>, 5% di CO<sub>2</sub>, 90% di N<sub>2</sub> e massima umidità e gli embrioni sono stati valutati al giorno 6 e 7 di sviluppo embrionale.



**Figura 10:** Blastocisti di Pecora in differenti stadi di sviluppo embrionale

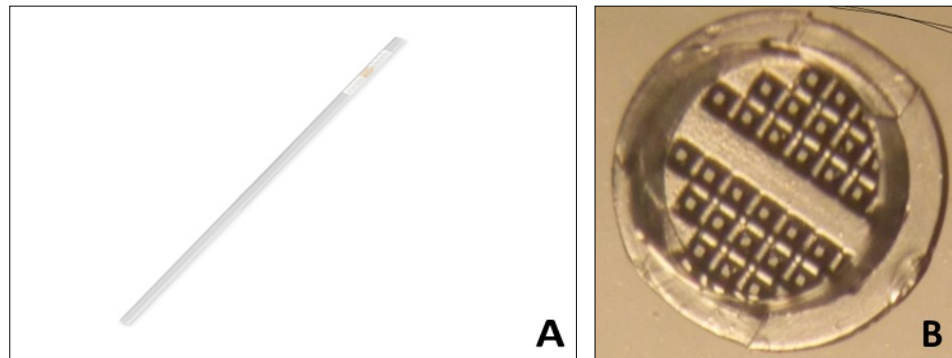
### 5.3.3 Vitrificazione embrioni

Tra il 6° e il 7° giorno, gli embrioni che hanno raggiunto lo stadio di giovane blastocisti (EBI) e blastocisti espansa (BI), sono stati selezionati per la vitrificazione.



**Figura 11:** Blastocisti di Pecora. A) giovane blastocisti. B) blastocisti espansa.

Il dispositivo usato è costituito da una straw del volume di 0.25 ml, al quale è stata aggiunta una griglia in policarbonato con pori del diametro di 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12:** A) esempio di straw. B) griglia con pori del diametro di 50  $\mu\text{m}$ .

I campioni sono caricati nella straw per aspirazione e in seguito è stata posizionata, all'estremità libera della straw, la griglia.

L'esperimento è stato svolto usando due differenti tecniche di vitrificazione:

- a) sistema dinamico;
- b) sistema a 2-step.

Entrambi i sistemi di vitrificazione prevedono l'utilizzo di due differenti soluzioni:

- soluzioni di Equilibratura (ES) costituita da TCM-199 + HEPES con addizionati i crioprotettori Glicole etilenico 8%, Dimetilsolfossido (DMSO) 8% e Albunina Sierica Bovina (BSA) 0.6%.
- soluzioni di Vitrificazione (VS) costituita da TCM-199 + HEPES con addizionati Glicole etilenico 18%, Dimetilsolfossido (DMSO) 18%

Entrambe le soluzioni sono state addizionate con Albumina Sierica Bovina (BSA) e Trealosio 0,5 M.

Gli embrioni, selezionati in base al loro stadio di sviluppo, sono stati esposti in MD e caricati nelle straws, avendo cura di lasciare una bolla d'aria all'estremità libera della straw. È stata poi inserita e bloccata la griglia con una rotazione della straw sulla griglia stessa.

#### **5.3.4 Sistema dinamico**

Il medium di dissezione con cui gli embrioni sono stati caricati all'interno della straw, è stato eliminato prima delle fasi di equilibratura. In seguito sono stati eseguiti 4 diversi passaggi della straw nelle soluzioni di equilibratura (ES) a concentrazioni crescenti di crioprotettori: ES1: 25%, ES2: 50%, ES3: 75%, ES4: 100%. Ciascun passaggio per un tempo di 1 minuto e 30 secondi, per un totale di 6 minuti. Successivamente la straw è stata esposta alle 2 soluzioni di Vittrificazione (VS), VS1: 75% e VS2: 100%, per 30 secondi ciascuna per un totale di 1 minuto. Tra la fase di Equilibratura e l'esposizione alla soluzione VS1, la soluzione ES è stata eliminata. La stessa procedura è stata eseguita tra la soluzione VS2 e l'immersione in azoto liquido della straw.

#### **5.3.5 Sistema 2 step**

Il Sistema a 2-step prevede l'impiego di una singola soluzione di Equilibratura ES al 100% e una singola soluzione di Vittrificazione, VS: 100%. Gli embrioni sono stati caricati nella straw e sono stati esposti alla ES per 5 minuti. In seguito la soluzione ES è stata

eliminata e gli embrioni sono stati esposti alla VS per 30 secondi. Tra il passaggio dalla soluzione VS e l'immersione in azoto liquido della straw, si è proceduto alla eliminazione della soluzione di vitrificazione.

### **5.3.6 Ripristino della temperatura**

Il ripristino della temperatura, in entrambi i sistemi di vitrificazione, è stato effettuato immergendo la straw, immediatamente dopo il prelievo dell'azoto liquido, in una soluzione di TCM-199 + 20% Siero Fetale Bovino (FCS) + Saccarosio a concentrazione decrescenti (1 M, 0.5 M e 0.25 M). La straw, con all'interno gli embrioni, è stata lasciata immersa in ogni soluzione per 5 minuti, successivamente rimossi dalla straw e posti in medium di coltura.

Per valutare le percentuali di recupero degli embrioni vitrificati in entrambi i sistemi, i dati sono stati registrati dopo l'apertura di ogni straw. I campioni sono stati lavati 2-3 volte con medium di coltura e posti a incubare a 38.5°C al 5% di CO<sub>2</sub> e massima umidità per le successive valutazioni effettuate dopo 2h, 24h e 48h.

In particolare:

dopo 2h è stata valutata la riespansione della cavità blastocelica

dopo 24h è stata valutata la sopravvivenza degli embrioni espansi, in fase di schiusa e schiusi

dopo 48h è stata valutata la schiusa e gli embrioni schiusi.



### **5.3.7 Analisi dell'apoptosi attraverso l'utilizzo della tecnica TUNEL e microscopio confocale**

Questa metodica è utilizzata per rivelare cellule che contengono rotture (nick) a singolo e a doppio filamento più o meno estese lungo la molecola di DNA nucleare.

La miscela di reazione TUNEL (ROCHE, Germany: "In situ cell death detection") è costituita da un enzima, la TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase), il quale catalizza la reazione di polimerizzazione di nucleotidi (aggiunti sempre alla miscela) marcati con fluoresceina (Gold et al., 1994), all'estremità libere 3'OH delle molecole di DNA frammentate sia a livello di singolo che di doppio filamento. I nucleotidi marcati "riempiono" le interruzioni a livello di singolo o doppio filamento presenti sul DNA ed emettono una tipica luce verde in fluorescenza, tanto più intensa quanto più sono estese le rotture sul DNA.

Gli embrioni crioconservati con i 2 sistemi di vitrificazione (Sistema dinamico e Sistema-2 step), dopo il ripristino della temperatura, sono stati fissati in paraformaldeide al 4% in PBS a 37°C per 1 ora. In seguito alla fissazione sono stati lavati 3 volte per 15 minuti in PBS per eliminare il fissativo residuo. Gli embrioni sono stati poi permeabilizzati con 0.1% Triton X 100 in 0.1% sodio citrato per 5 minuti a 4 °C.

La permeabilizzazione ha lo scopo di rendere permeabile la zona pellucida all'ingresso dei reagenti che si aggiungeranno successivamente. I campioni sono stati incubati in miscela TUNEL (Enzyme Solution + Label Solution) per 1 ora a 38.5°C al buio.

Come controllo negativo, alcuni embrioni del gruppo controllo, sono stati incubati in presenza di Label Solution e processati successivamente, come descritto di seguito per gli altri gruppi di embrioni vitrificati.

In seguito all'incubazione, gli embrioni sono stati lavati 3 volte per 15 minuti in PBS, sono stati colorati con una soluzione di Glicerolo-Hoechst 33342 (10 µg/ml) per la valutazione della cromatina nucleare dei blastomeri. Su un vetrino porta-oggetto è stata posizionata una goccia di soluzione colorante all'interno della quale venivano trasferiti gli embrioni (3-5 embrioni). Veniva quindi posizionato un vetrino coprioggetto sulla goccia, che schiacciava leggermente gli embrioni, al fine di facilitare la visualizzazione dei nuclei.

Il vetrino veniva quindi tenuto per 1 ora al buio a 4 °C e al termine di questo periodo d'incubazione veniva eseguita la lettura al microscopio confocale. Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale a scansione laser (Leica TCS SP5), dotato di 543 nm HeNe, 488 nm Argon e 405 nm 405-diode laser utilizzando un obiettivo a immersione (in olio) 40 × (NA = 1,25). I parametri relativi all'intensità della fluorescenza (laser energy, gain, offset and pinhole size) sono stati mantenuti con valori costanti durante tutte le acquisizioni di immagini.

La fluorescenza verde di Tunel è stata determinata utilizzando a lunghezze d'onda di eccitazione di 488 e 543 nm e spettri di emissione di 500-530 nm (verde) e superiori a 560 nm (rosso).

Negli embrioni analizzati, il rapporto tra i nuclei marcati TUNEL e il numero totale di cellule è stato definito come indice frammentazione del DNA (DFI).

## 5.4 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata effettuata utilizzando il software StataIC 11.2 (StataCorp LP, USA). Le percentuali di recupero, di riespansione, sopravvivenza alle 24 ore, competenza allo sviluppo alle 48 ore e apoptosi sono state comparate nei due diversi stadi di sviluppo embrionale (6 e 7 giorni) e nei due diversi sistemi di vitrificazione (dinamico e 2-step) utilizzando il test del Chi-quadro  $\chi^2$  con Bonferroni come test post-hoc.

Le differenze con  $P < 0,05$  sono state considerate statisticamente significative.

## 5.5 Risultati

### 5.5.1 Recupero embrioni

Le percentuali di recupero, dopo ripristino della temperatura con griglia avente pori di del diametro di 50  $\mu\text{m}$ , calcolate sul totale degli embrioni, sono riportate in Tabella 9.

In seguito ad analisi statistica non sono state riscontrate differenze significative nelle percentuali di recupero per i diversi stadi embrionali e metodi di vitrificazione

( $P > 0.05$ ).

	<i>Stadio</i>	<i>Totali</i>	<i>Recuperati</i>	<i>Recuperati (%)</i>
--	---------------	---------------	-------------------	-----------------------

	<i>embrionale</i>			
<i>Sistema Dinamico</i>	6gg	40	32	80.00%
	7gg	95	86	89.47%
<i>Sistema 2 step</i>	6gg	40	33	82.20%
	7gg	90	80	88.89%

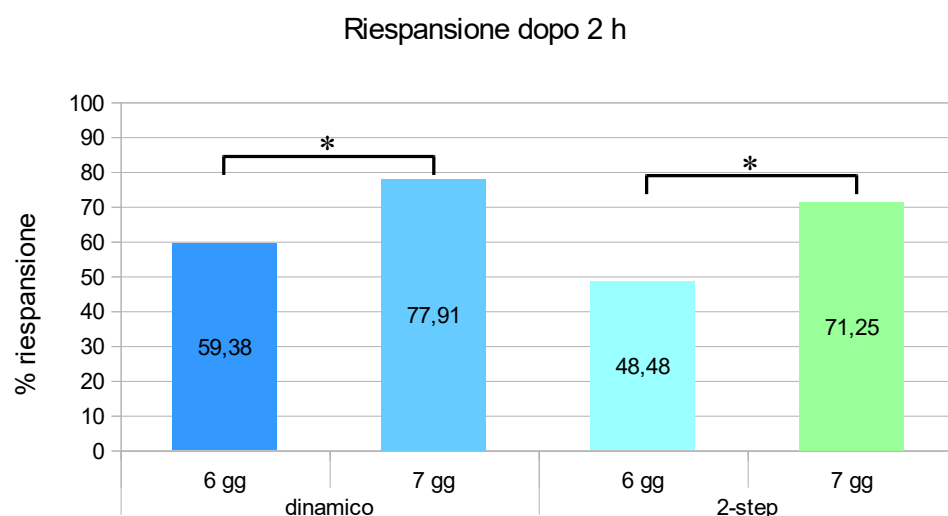
**Tabella 9:** Percentuale di embrioni a 6 e 7 giorni di sviluppo, recuperati dopo ripristino della temperatura con il nuovo dispositivo (griglia con pori di 50 µm) e con i due sistemi di vitrificazione

### 5.5.2 Riespansione dopo 2 ore

A 2 ore dal ripristino della temperatura, il metodo di vitrificazione (dinamico vs 2-step) non ha condizionato le percentuali di riespansione della cavità blastocelica delle blastocisti a 6 o 7 giorni di sviluppo ( $P > 0.05$ ).

Tuttavia lo stadio di sviluppo embrionale al momento della vitrificazione (6 giorni vs 7 giorni) ha influito significativamente sulle percentuali di riespansione all'interno dei due metodi utilizzati. In particolare nel sistema dinamico le percentuali di riespansione sono state del 77.91% negli embrioni a 7 giorni e di 59.38% in quelli a 6 giorni ( $P < 0.05$ ).

Il sistema a 2-step ha rivelato un trend simile, con percentuali di riespansione degli embrioni a 7 giorni di 71.25% e di 48.48% in quelli a 6 giorni ( $P < 0.05$ )



**Figura 13:** Percentuali di riespansione della cavità blastocelica delle blastocisti a 6 e 7 giorni di sviluppo dopo vitrificazione con metodo dinamico e a 2-step. (\*) indica differenze significative per  $P < 0.05$ .

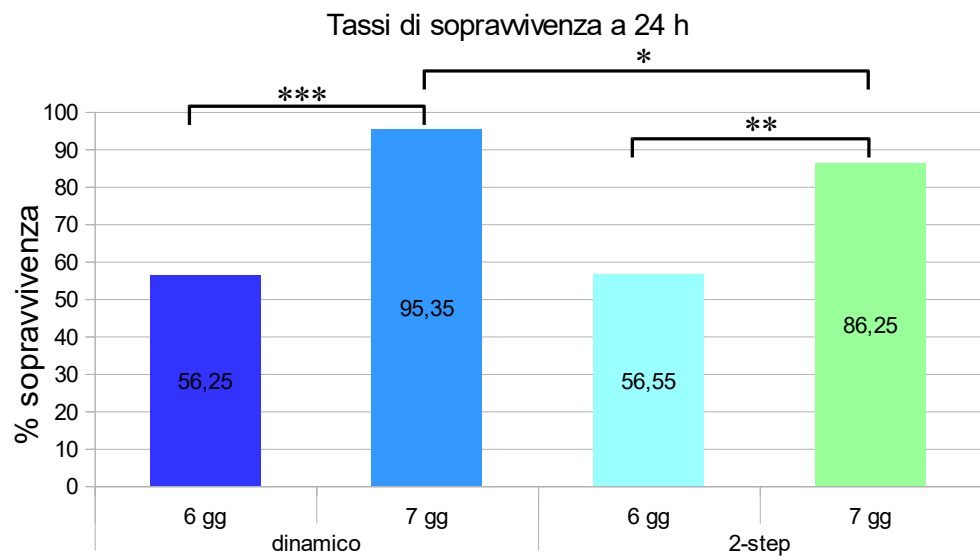
### 5.5.3 Sopravvivenza delle blastocisti dopo 24h di coltura *in vitro*

Il metodo di vitrificazione utilizzato (dinamico vs 2-step) e lo stadio di sviluppo dell'embrione al momento della vitrificazione (6 gg e 7gg), alle 24 ore dal ripristino della temperatura hanno influito significativamente sulle percentuali di sopravvivenza delle blastocisti (espanso, in fase di schiusa e schiuse).

Infatti, al 7° giorno di sviluppo embrionale, con il metodo dinamico la percentuale di blastocisti sopravvissute (95.35%) era significativamente più alta rispetto alla percentuale di sopravvissute con il metodo a 2-step (86.25 % ;  $P < 0.05$ ).

Tuttavia, al 6° giorno di sviluppo embrionale non sono state riscontrate differenze significative nelle percentuali di sopravvivenza nei due sistemi usati ( $P > 0.05$ ).

Inoltre, le percentuali di sopravvivenza erano più alte nelle blastocisti vitrificate al 7° giorno, rispetto a quelle vitrificate al 6° giorno, sia nel metodo dinamico (rispettivamente 95.35% e 56.25%;  $P < 0.0001$ ) che nel metodo a 2-step (rispettivamente 86.25% e 56.55%;  $P < 0.001$ ; Fig. 14).



**Figura 14:** Percentuali di sopravvivenza a 24h di blastocisti a 6 e 7 giorni dopo vitrificazione con metodo dinamico e a 2-step. (\*) indica differenze significative per  $P < 0.05$ . (\*\*) indicano differenze significative per  $P < 0.01$ . (\*\*\*) indicano differenze significative per  $P < 0.001$ .

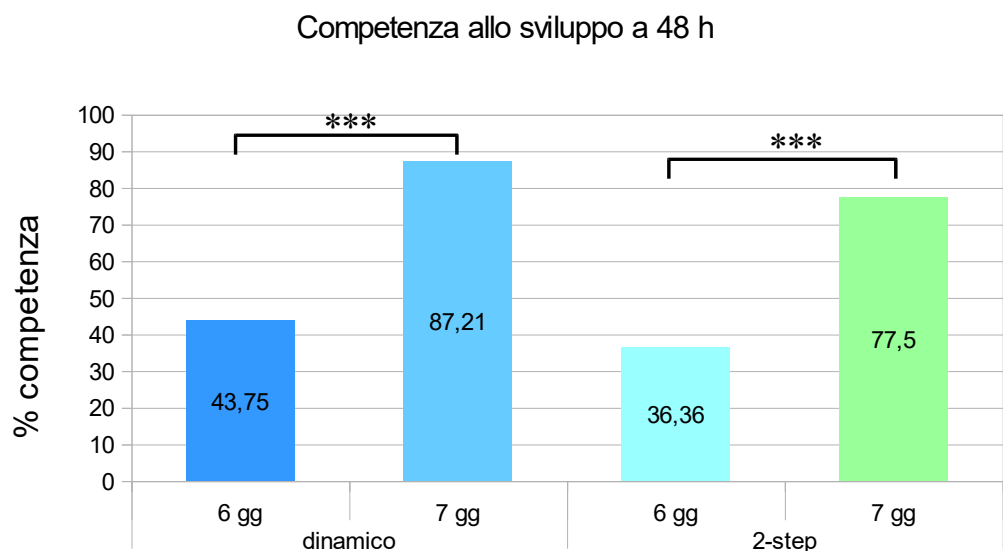
#### 5.5.4 Competenza allo sviluppo dopo 48h di coltura *in vitro*

A 48 h dal ripristino della temperatura il metodo di vitrificazione (dinamico vs 2-step) non ha influito significativamente sulla percentuale di schiusa delle blastocisti.

Tra il metodo dinamico e il metodo a 2-step, infatti, non sono state riscontrate differenze nella competenza allo sviluppo nelle blastocisti a 6 e 7 giorni ( $P > 0.05$ ).

Invece, lo stadio di sviluppo embrionale, ha condizionato significativamente la competenza delle blastocisti indipendentemente dal sistema di vitrificazione.

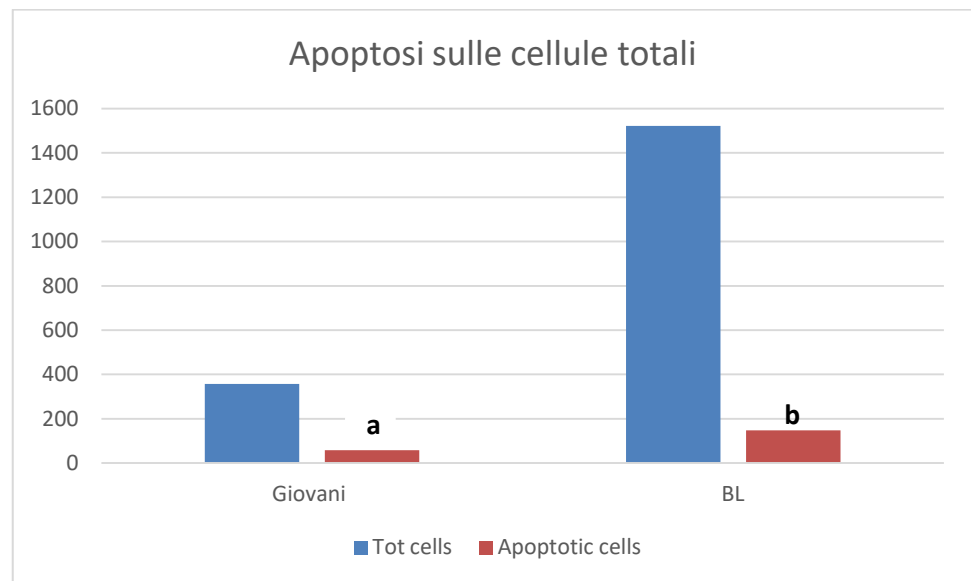
Infatti, le percentuali di competenza erano significativamente più alte nelle blastocisti vitrificate a 7 giorni rispetto a quelle vitrificate a 6 giorni, sia nel metodo dinamico (rispettivamente 87.21% vs 43.75%;  $P < 0.001$ ) sia nel metodo a 2-step (rispettivamente 77.5% vs 36.36%;  $P < 0.001$ ).



**Figura 15:** Percentuali di competenza allo sviluppo a 48h di blastocisti a 6 e 7 giorni dopo vitrificazione con metodo dinamico e a 2-step. (\*\*\*) indicano differenze significative per  $P < 0.001$ .

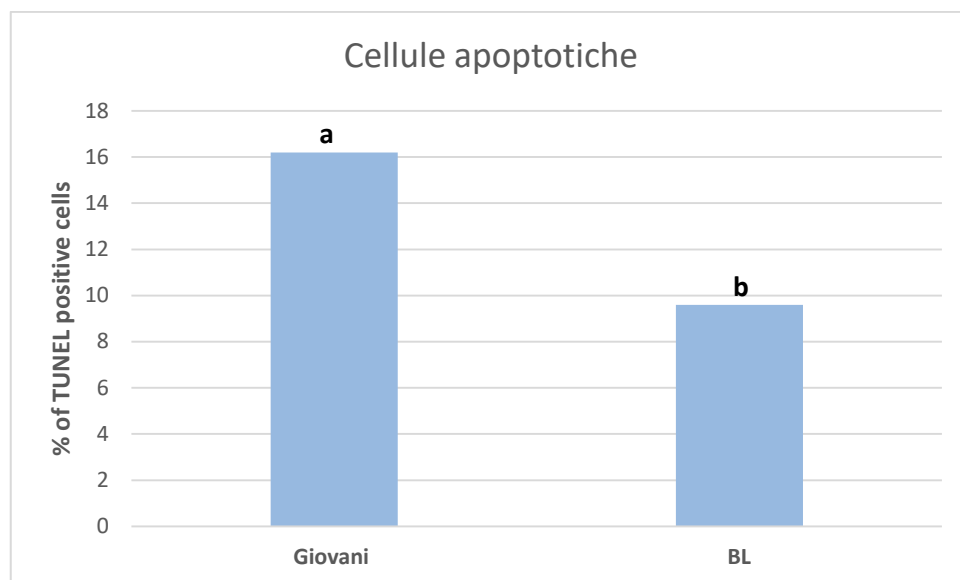
### 5.5.5 Frammentazione del DNA e analisi TUNEL

I risultati inerenti la frammentazione del DNA valutata mediante la tecnica del Tunel impiegando i due sistemi di vitrificazione, hanno evidenziato come nel sistema dinamico la percentuale di cellule apoptotiche risultava essere maggiore nel gruppo delle giovani blastocisti rispetto al gruppo delle blastocisti espanse (16,24% vs 9,65%;  $P < 0.001$ )



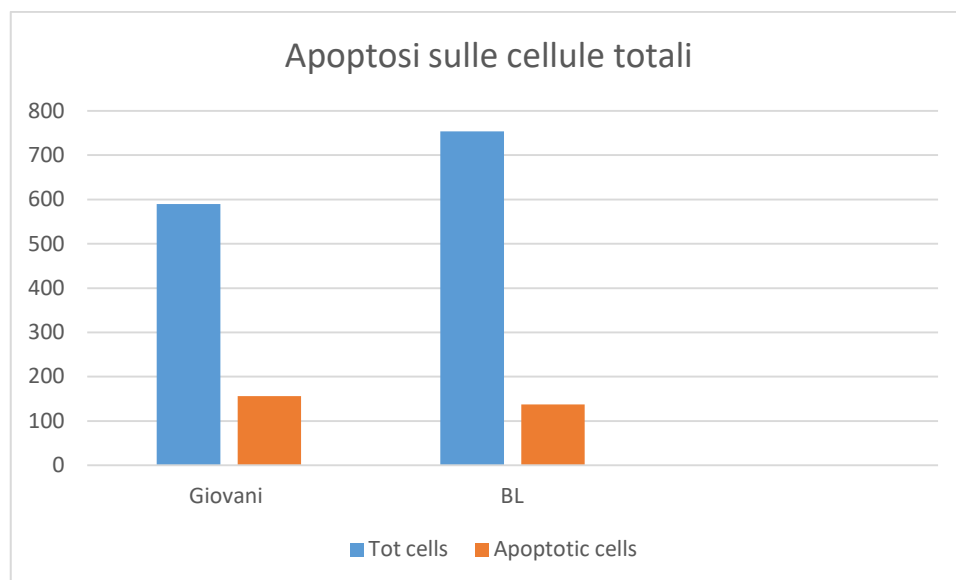
**Figura 16:** Numero totale di cellule apoptotiche nei due diversi stadi di sviluppo a blastocisti, con il sistema dinamico.



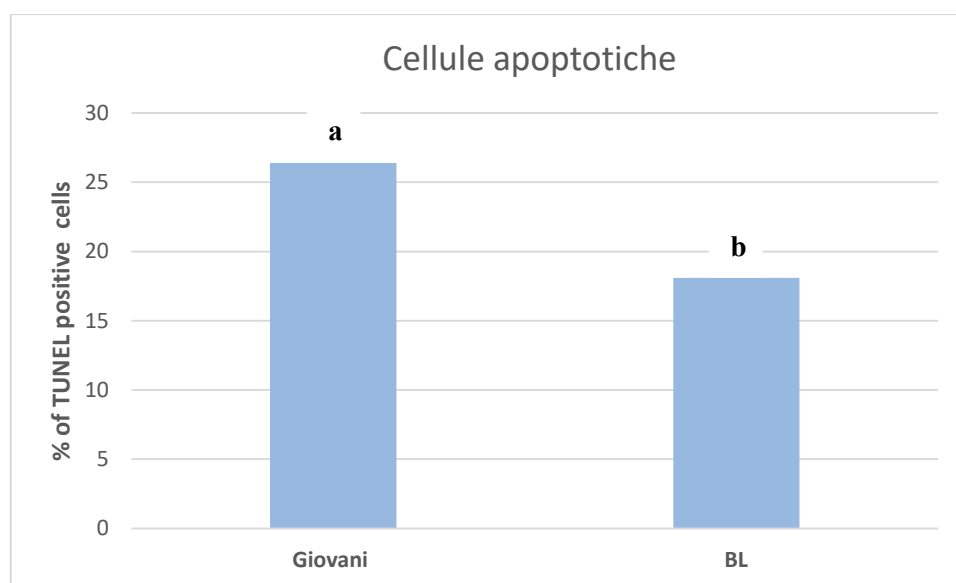


**Figura 17:** Percentuale di cellule apoptotiche nei due diversi stadi di sviluppo a blastocisti, con il sistema dinamico (16,24% vs 9,65%;  $P < 0.001$ ).

I dati inerenti l'apoptosi, utilizzando il sistema di vitrificazione 2-step, hanno indicato che la percentuale di cellule in cui è presente un danno del DNA risultava essere significativamente più elevato nelle giovani blastocisti rispetto al gruppo delle blastocisti espanse (26,4% vs 18,1%;  $P < 0.001$ ).



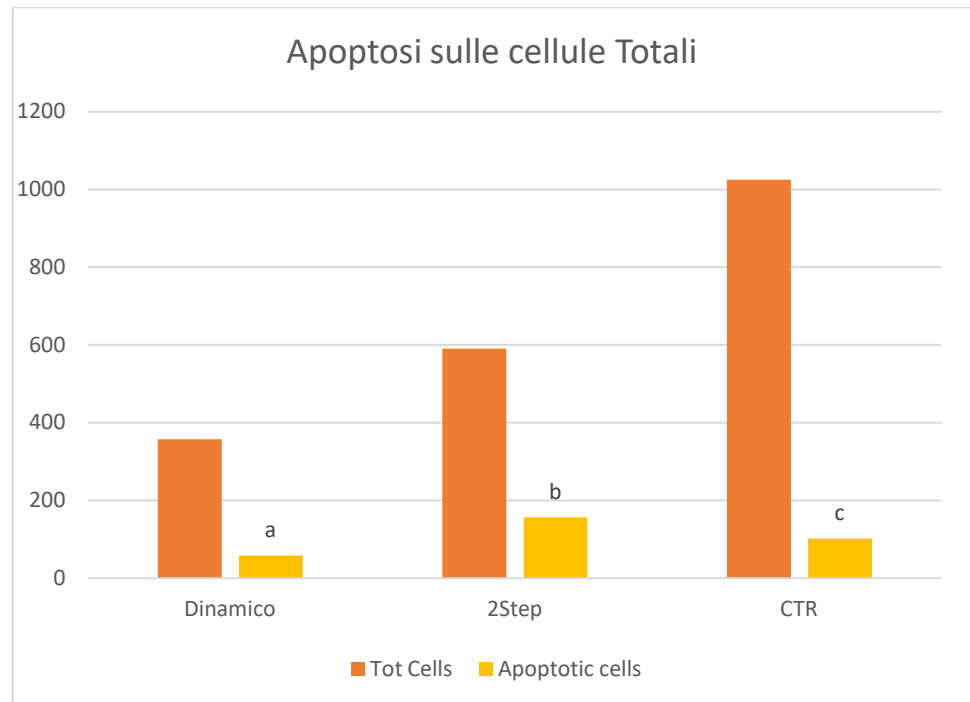
**Figura 18:** Numero totale di cellule apoptotiche nei due diversi stadi di sviluppo a blastocisti, con il sistema 2-step.



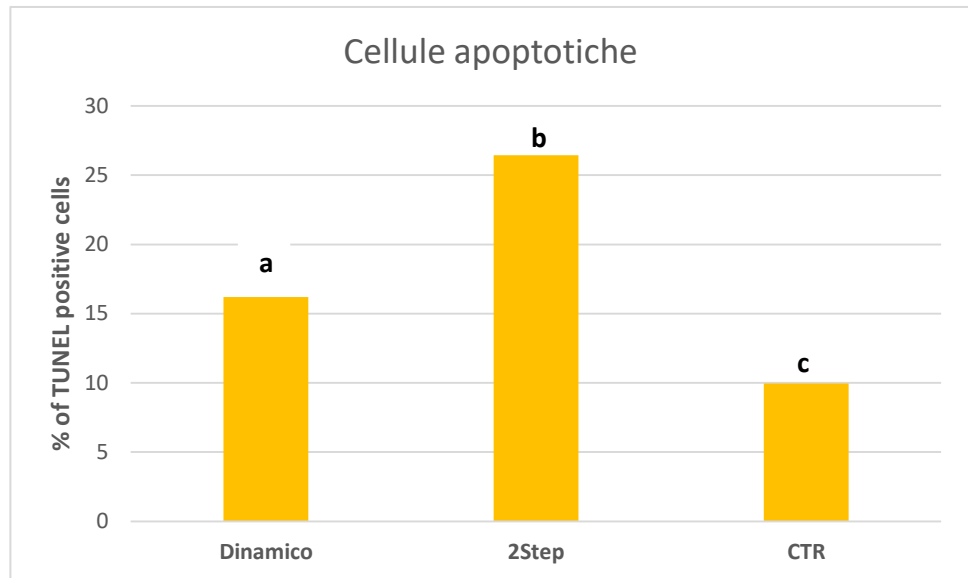
**Figura 19:** Percentuale di cellule apoptotiche nei due diversi stadi di sviluppo a Blastocisti, con il sistema 2-Step (26,4% vs 18,1%;  $P < 0.001$ ).

La comparazione tra i due sistemi di vitrificazione ha evidenziato come negli embrioni vitrificati allo stadio di giovani blastocisti le percentuali di apoptosi siano significativamente più elevate nel

Sistema 2-step rispetto al Sistema Dinamico e al gruppo controllo (26,44% vs 16,2%). Comparando i dati ottenuti impiegando entrambi i sistemi, questo sono significativamente più alti rispetto al gruppo di Controllo (9,95%).

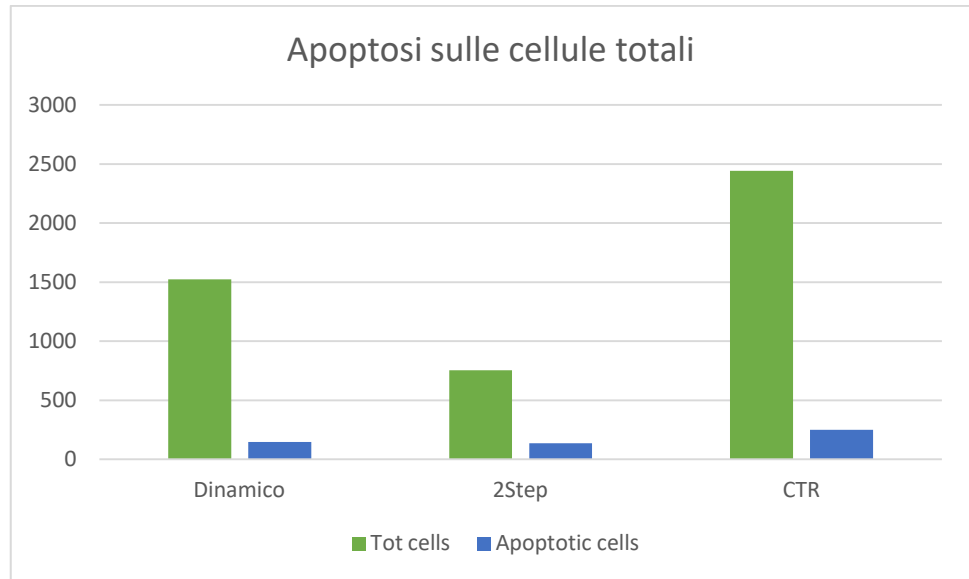


**Figura 20:** Numero totale di cellule apoptotiche nelle giovani blastocisti, con il sistema dinamico, 2-step e gruppo controllo.

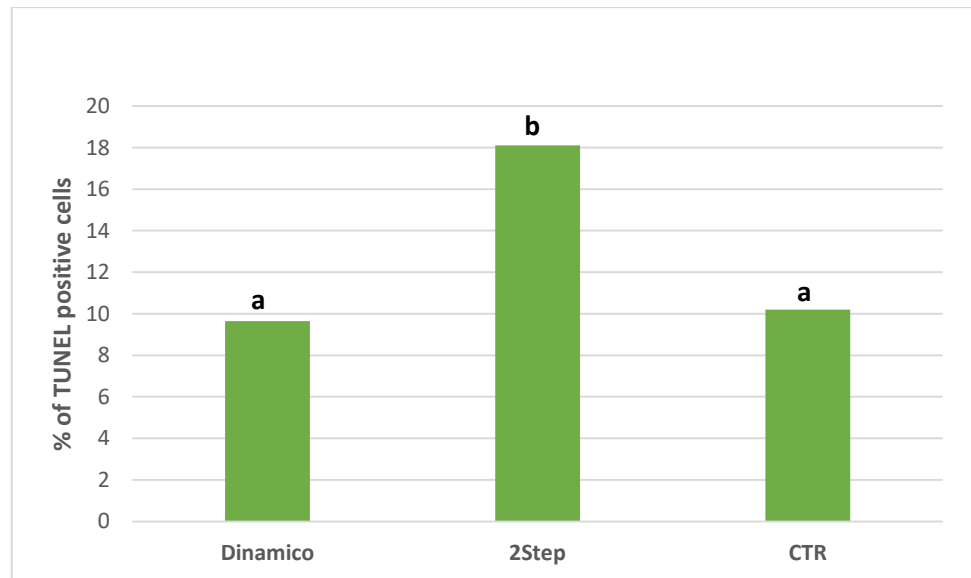


**Figura 21:** Percentuale di cellule apoptotiche nelle giovani blastocisti, con il sistema dinamico, 2-step e gruppo controllo. ( $P < 0.001$ ).

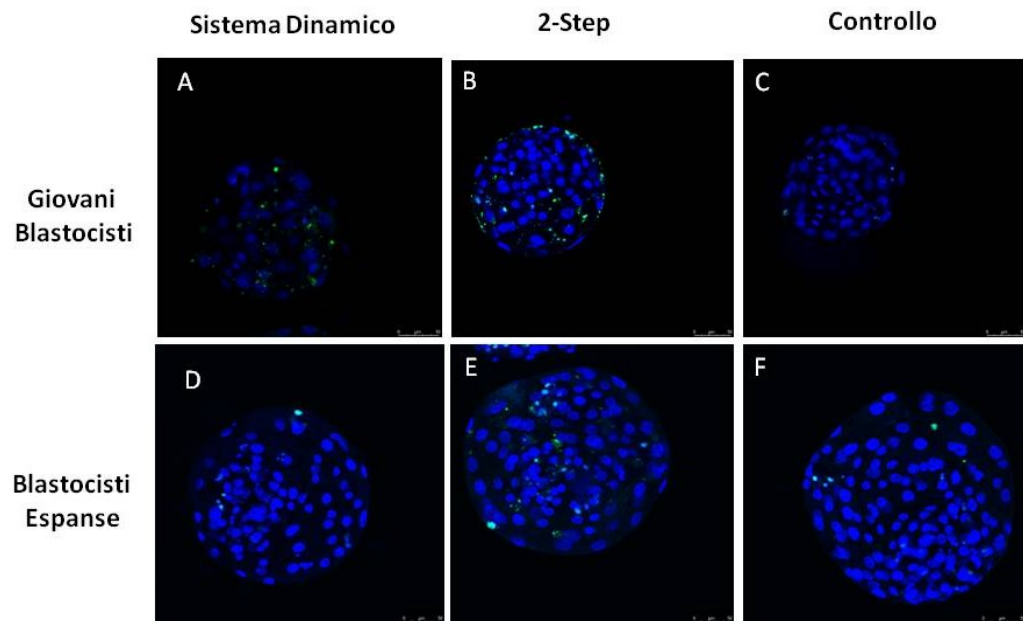
Gli embrioni crioconservati allo stadio di Blastocisti espansa hanno mostrato come, in seguito a vitrificazione con il Sistema Dinamico, le percentuali di apoptosi siano significativamente più basse rispetto a quelle ottenute vitrificando gli embrioni con il Sistema 2-Step (18,1%). I risultati ottenuti con il Sistema Dinamico sono inoltre simili a quelli ottenuti negli embrioni del gruppo Controllo (9,65% vs 10,2%).



**Figura 22:** Numero totale di cellule apoptotiche nelle blastocisti espanse, con il sistema dinamico, 2-step e gruppo controllo.



**Figura 23:** Percentuale di cellule apoptotiche nelle blastocisti espanse, con il sistema dinamico, 2-step e gruppo controllo. ( $P < 0.001$ ).



**Figura 24:** Blastocisti sottoposte al trattamento con la tecnica del TUNEL osservate al microscopio confocale.

## 5.6 Discussione

La crioconservazione degli embrioni rappresenta una delle tecnologie fondamentali per la diffusione in campo delle biotecnologie applicate alla riproduzione degli animali di interesse zootecnico, per il miglioramento dell'efficienza riproduttiva degli animali e l'accelerazione della selezione genetica, permettendo la diffusione di genotipi selezionati in tempi ridotti e per lunghe distanze.

La crioconservazione assume un ruolo importante in quanto consente, grazie alla possibilità di conservare gli embrioni nel tempo, di programmare i trasferimenti embrionali, semplificando i costi, le procedure e migliorando il benessere animale.

Nello specifico, le tecnologie riproduttive nella specie ovina non hanno lo stesso riscontro economico osservato in altre specie (Romão et, al., 2016) per via di criticità riguardanti soprattutto la mediocre qualità del materiale seminale crioconservato e le difficoltà tecniche/anatomiche legate al trasferimento embrionale effettuato in condizioni di campo ne riducono significativamente la loro applicabilità. Tuttavia gli studi effettuati nel campo delle biotecnologie riproduttive ed in particolare della crioconservazione degli embrioni sono necessari e fondamentali per facilitare il progresso genetico in questa importante specie di interesse zootecnico, che oltretutto viene anche largamente utilizzata come modello in campo umano.

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare l'efficienza di un nuovo dispositivo in policarbonato da utilizzare nel processo di vitrificazione di embrioni di ovino con due differenti protocolli. L'efficienza della vitrificazione è stata determinata su due diversi stadi di sviluppo embrionale (blastocisti a 6 e 7 giorni) valutando, in seguito a ripristino della temperatura, i tassi di sopravvivenza e di competenza allo sviluppo. La prima importante valutazione che è stata effettuata nel presente studio è stata l'efficienza del nuovo dispositivo, la griglia con pori del diametro da 50  $\mu\text{m}$ , nella delicata fase di recupero degli embrioni in seguito a ripristino della temperatura. I risultati ottenuti hanno mostrato dei tassi di recupero (~ 85%) lievemente inferiori rispetto a quelli ottenuti in precedenti lavori che hanno previsto l'impiego di differenti dispositivi. Oltre ai soddisfacenti tassi di recupero, per valutare pienamente l'efficacia del device utilizzato nel presente report, è necessario considerare ulteriori benefici dell'impiego della griglia.

In primo luogo, l'utilizzo della griglia ha permesso, nel presente esperimento, di poter eseguire tutti i passaggi nelle varie soluzioni di equilibratura e di vitrificazione mantenendo gli embrioni sempre all'interno della straw evitando dunque un eccessivo maneggiamento del campione e infine, con lo stesso dispositivo, procedere al diretto trasferimento in animali riceventi.

Inoltre l'impiego del presente dispositivo ha permesso di ridurre notevolmente il volume della soluzione di vitrificazione aumentando così il tasso di raffreddamento e di ripristino della temperatura seguendo il principio in base al quale negli ultimi decenni, sono stati progettati diversi devices innovativi nel campo della vitrificazione come ad esempio le open pulled straws (OPS, Vajta et al., 1997), il cryoloop (Lane et al., 1999) e il cryotop (Kuwayama and Kato, 2000).

Un altro importante dato rilevabile nel seguente studio è stato quello riguardante i due differenti sistemi di vitrificazione utilizzati. Questa parte dello studio era volta a identificare un protocollo che permettesse un miglioramento dei tassi di sopravvivenza e di competenza allo sviluppo (importanti marker di qualità embrionale) nella vitrificazione degli embrioni di ovino cercando di minimizzare i danneggiamenti indotti dalla tossicità dei crioprotettori e dal trattamento ipotermico. Infatti è stato osservato che la scelta del crioprotettore e della sua concentrazione ma anche delle soluzioni base può influenzare la vitalità embrionale e il suo conseguente potenziale di sviluppo (Pugh et al., 2000; Cocero et al., 2002).

Sono stati quindi comparati due differenti protocolli di vitrificazione: i) il sistema dinamico, che permette una esposizione



graduale e dinamica dell'embrione a gradienti di concentrazioni crescenti di crioprotettori; ii) il sistema a due-step, che non prevede una esposizione graduale del campione a concentrazioni crescenti di crioprotettori ma solo alle soluzioni madre di equilibratura e vitrificazione.

A tal fine, è stata presa in considerazione la riespansione della cavità blastocelica in seguito a ripristino della temperatura in accordo con Leoni et. al., secondo i quali, negli embrioni di ovino prodotti *in vitro*, la valutazione di questo parametro entro le 8 ore è un affidabile indicatore di sopravvivenza e di competenza allo sviluppo (Leoni et.al, 2008). Sono state inoltre valutate le percentuali di sopravvivenza alle 24 ore e le percentuali di schiusa e in fase di schiusa alle 48 ore.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che le percentuali di riespansione della cavità blastocelica a 2 ore dal ripristino della temperatura e le percentuali di embrioni in schiusa e in fase di schiusa alle 48 ore non differivano nei due sistemi usati.

Tuttavia, nel presente studio è stato osservato che il tasso di sopravvivenza degli embrioni alle 24 ore dal ripristino della temperatura era significativamente superiore nel metodo dinamico rispetto al metodo a due-step. In generale, i tassi ottenuti sono risultati più alti rispetto quelli riportati in precedenti lavori. Ad esempio, Succu et al. hanno ottenuto con meno passaggi con concentrazioni crescenti di crioprotettori, una riespansione totale del 33% (comparato ad una media del 65% di blastocisti espanse del presente esperimento) e un tasso di schiusa del 14%, decisamente più basso rispetto a quanto da noi riportato (52%) di schiuse (Succu et al., 2014). Nel presente lavoro è stato inoltre

valutato come lo stadio di sviluppo dell'embrione (blastocisti giovane vs blastocisti espansa) possa influire sui tassi di sopravvivenza e successiva competenza allo sviluppo in seguito alla vitrificazione.

Un motivo per cui non siano state riscontrate particolari differenze tra i due sistemi di vitrificazione nel presente esperimento potrebbe essere il fatto che il cocktail di crioprotettori selezionati per il presente esperimento sia considerato tra i meno dannosi per le cellule (Ishimori et al., 1992a, b, 1993). Infine abbiamo comparato due stadi di sviluppo differenti (blastocisti giovane vs blastocisti espansa) e valutato quali tra i due stadi poteva maggiormente resistere ad un protocollo di vitrificazione.

È infatti noto che una buona riuscita delle tecniche di crioconservazione embrionale dipenda da diversi fattori tra i quali, quello particolarmente più notevole risulta lo stadio di sviluppo embrionale utilizzato al momento della vitrificazione.

È stato osservato che, con l'avanzare dello sviluppo, gli embrioni si mostrano più resistenti alla crioconservazione; in particolare è stato dimostrato che, il raggiungimento dello stadio di blastocisti, conferisce all'embrione una maggiore resistenza agli insulti derivanti dal trattamento con il freddo (Naitana et al., 1995; Vajta et al., 1996).

I nostri risultati confermano queste teorie, infatti, indipendentemente dal metodo utilizzato, abbiamo registrato una percentuale significativamente maggiore in termini di riespansione dopo ripristino della temperatura, di sopravvivenza alle 24 ore e infine per la percentuale di schiusi e in fase di schiusa alle 48 ore.

Nell'ultimo caso abbiamo registrato una media dell'82% nelle blastocisti espanse contro il 40% nelle blastocisti giovani. Risultati simili sono stati ottenuti anche da dos Santos Neto et al., (2015) che hanno ottenuto una percentuale di schiusi del 36,5% in blastocisti giovani. Inoltre nello studio di Shirazi et al., (2010) sono stati valutati anche stadi embrionali, 4-8-16 cellule e lo stadio di morula e le percentuali di schiusa da loro ottenuti sono concordi con il trend dei nostri risultati (rispettivamente 0%, 6%, 7% e 11%) sottolineando l'importanza di vitrificare il campione in uno stadio di sviluppo più avanzato, quello di blastocisti dove loro hanno raggiunto una percentuale di schiusa pari al 38%.

Inoltre, possiamo osservare che i nostri risultati, rispetto a questo lavoro risultano più soddisfacenti in quanto allo stadio di blastocisti espansa abbiamo raggiunto una media del 76% di embrioni schiusi.

In generale, abbiamo osservato che l'utilizzo del nuovo dispositivo non comporta una perdita del materiale e anzi facilita i vari passaggi che vengono eseguiti dall'operatore, inoltre non c'è stata una significativa differenza tra i due protocolli di vitrificazione impiegati se non nella percentuale di sopravvivenza alle 24 ore.

La differenza maggiore è invece stata riscontrata quando siamo andati a comparare i diversi stadi embrionali sottoposti a vitrificazione, tant'è che indipendentemente dal metodo usato i risultati sono stati a favore della vitrificazione degli embrioni allo stadio di blastocisti. Dall'analisi dell'apoptosi cellulare sono emersi dati particolarmente interessanti. Il primo dato che emerge è che l'apoptosi cellulare è più elevata nelle giovani blastocisti rispetto alle blastocisti espanse. Ciò, in linea con i risultati della vitrificazione suggerisce che la fase migliore per la

crioconservazione degli embrioni di ovino sia proprio tale stadio di maturazione. Per quanto concerne il confronto tra i due metodi utilizzati, dinamico e 2step, dallo studio dell'apoptosi cellulare emerge come il metodo dinamico sia notevolmente più efficace rispetto al metodo 2step per la vitrificazione degli embrioni di ovino. Tale risultato rispetto alle fasi di riespansione dopo 2, 24 e 48 ore è invece molto marcato. I dati dimostrano ampiamente infatti come l'apoptosi sia più bassa nel metodo dinamico rispetto al metodo 2 step sia nelle giovani blastocisti (16,2% vs 26,44%), che nelle blastocisti espanse (9,65% vs 18,1%). Nel gruppo delle blastocisti espanse addirittura non risulta esserci differenza significativa tra il metodo dinamico e il gruppo controllo, mentre il metodo 2step riporta sempre alti tassi di apoptosi cellulare.

In Sintesi, il nuovo dispositivo (griglia con pori di 50 um) risulta un valido devices da poter impiegare nei comuni protocolli di vitrificazione. La caratteristica di poter trattenere l'embrione dentro la straw permette sia di semplificare il lavoro dell'operatore, evitando passaggi laboriosi, sia di stressare di meno la cellula. Inoltre la presenza dei pori permette una eliminazione facile e veloce delle soluzioni impiegate nel protocollo facendo in modo che, quando questo viene inserito in azoto liquido, ci sia una quantità bassa di soluzione migliorando così i tassi di raffreddamento e di ripristino della temperatura. Inoltre uno degli obiettivi successivi è quello di impiegare direttamente questo dispositivo nelle successive fasi di impianto dell'embrione.

## 6 CONCLUSIONI

Il presente studio ha avuto come obiettivo la ricerca di nuove e innovative metodologie per la crioconservazione del germoplasma nella specie ovina. Tale ricerca è volta al miglioramento dei sistemi di crioconservazione del germoplasma i quali potrebbero apportare notevoli vantaggi. Sono stati studiati e testati diversi protocolli innovativi che prevedevano l'utilizzo di sistemi nuovi per la crioconservazione. Nel primo esperimento si è proceduto alla crioconservazione del seme di ariete con delle soluzioni che contenevano crioprotettori a bassa tossicità, utilizzando la tecnica del partial freeze-drying. I risultati ottenuti sono stati incoraggianti e hanno dimostrato come con soluzioni di crioprotettori a bassa tossicità si possa ottenere una buona vitalità usando la liofilizzazione come tecnica alternativa al congelamento classico. Gli obiettivi sono stati raggiunti e potrebbero essere l'inizio di una serie di studi che potrebbero portare a uno sviluppo sempre più importante della liofilizzazione.

Nel secondo esperimento abbiamo dimostrato come si possa crioconservare il tessuto testicolare di soggetti prepuberi mantenendo una buona vitalità post scongelamento. La parte

innovativa dell'esperimento è stata rappresentata dall'impiego di un nuovo dispositivo, l'E-Vit, costituito da una straw del diametro di 0.25 ml, al quale è stata aggiunta una griglia in policarbonato con pori del diametro di 50  $\mu\text{m}$ . Tale micro-strumento permette che tutte le procedure di crioconservazione siano effettuate al suo interno senza dover maneggiare direttamente il tessuto. Ne deriva che sia l'operatore che il tessuto traggono notevoli vantaggi da questo sistema alternativo. L'applicazione su larga scala di questa tecnica potrebbe essere di notevole aiuto sia nella pratica clinica umana, dove in pazienti oncologici o sottoposti a trattamenti particolari si potrebbe preservare a lungo termine la fertilità, sia nell'ambito della salvaguardia della fauna e del mantenimento della biodiversità.

L'utilizzo del dispositivo E-Vit è stato testato anche per la vitrificazione di blastocisti di ovino. In quest'ambito si sono registrati dei dati particolarmente incoraggianti. Utilizzando delle soluzioni a bassa tossicità e con metodi diversi si è provveduto a vitrificare embrioni a vari stadi di sviluppo con il notevole vantaggio di poter trattenere l'embrione dentro la straw semplificando il lavoro dell'operatore, evitando passaggi laboriosi e stressando di meno la cellula. I parametri esaminati dopo il ripristino della temperatura indicano questa tecnica come particolarmente valida nella crioconservazione di embrioni ovini. L'utilizzo di questa tecnica in futuro potrebbe portare dei vantaggi ancora più importanti. Potrebbe permettere infatti di svolgere le procedure di embryo-transfer direttamente utilizzando la straw senza dover manipolare gli embrioni e poter svolgere tutti i procedimenti in campo, con risparmi notevoli per l'operatore e per chi usufruisce di tale pratica. Inoltre tale dispositivo potrebbe

permettere l'utilizzo di sistemi automatizzati che permetterebbero di semplificare i vari passaggi e diminuirebbero drasticamente le percentuali di errore umano.

In conclusione l'applicazione di tutte queste metodologie descritte unite a un sempre maggior perfezionamento delle tecniche potrebbe in futuro apportare enormi vantaggi sia in campo zootecnico che in ambito clinico, aprendo la strada a un approccio diverso alla crioconservazione di germoplasma, cellule e tessuti.

## **BIBLIOGRAFIA**

- AbdelHafez F., Xu J., Goldberg J. And Desai N. 2011. Vitrification in Open and Closed Carriers at Different Cell Stages: Assessment of Embryo Survival, Development, DNA Integrity and Stability during Vapor Phase Storage for Transport. AbdelHafez et al. BMC Biotechnology 2011, 11:29
- Abrishami M, Anzar M, Yang Y, Honaramooz A. Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. Theriogenology 2010;73:86–96.
- Aliakbari F, Gilani M, Amidi F, Baazm M, Korouji M, Izadyar F, Yazdekhashti H. Improving the efficacy of cryopreservation of spermatogonia stem cells by antioxidant supplements. Cell Reprod 2016;18:87–95.

- Anchamparuthy V.M., Pearson R.E., Gwazdauskas F.C. Expression pattern of apoptotic genes in vitrified-thawed bovine oocytes. *Reprod Domest Anim.* 2010;45:e83e90.
- Arav A 1992 Vitrification of oocytes and embryos. In *New Trends in Embryo Transfer*, edn 1, pp 255–264. Eds A Lauria & F Gandolfi. Cambridge: Portland Press.
- Arav A, Gavish Z, Elami A, Silber S, Patrizio P. Ovarian survival 6 years after whole organ cryopreservation and transplantation. *Fertil Steril* 2007; 88(Supplement 1):S352 (abstract).
- Arav A, Natan D. Freeze drying (lyophilization) of red blood cells. *J Trauma Acute Care Surg* 2011;70 (5):S61-S64.
- Arav A, Saragusty J. Directional freezing of sperm and associated derived technologies. *Anim Reprod Sci* 2016;169:6-13.
- Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I & Gacitua H 2002 New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187 77–81. (doi:10.1016/S0303-7207(01)00700-6).
- Arav A, Yehudit N, Kalo D, Komsky-Elbaz A, Roth A, Levi-Setti PE, Leong M, Patrizio PR. A new, simple, automatic vitrification device: preliminary results with murine and bovine oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2018 May 25. doi: 10.1007/s10815-018-1210-9
- Arav A. Large tissue freezing. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20 (9):351.
- Arav A. Vitrification of oocytes and embryos. In: Lauria A., Gandolfi F., (eds). *New Trends in Embryo Transfer*. Cambridge: Portland Press 1992; 255 – 264.



- Arav A., Yavin S., Zeron Y., Natan D., Dekel I., Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; 187 77–81.
- Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med* 1996;2:693–696.
- Baert Y, Goossens E, van Saen D, Ning L, in't Veld P, Tournaye H. Orthotopic grafting of cryopreserved prepubertal testicular tissue: in search of a simple yet effective cryopreservation protocol. *Fertil Steril* 2012;97:1152–1157.
- Bartolac L.K, Lowe J.L., Koustas G., Sjöblom C. Grupen C.G. 2015. A comparison of different vitrification devices and the effect of blastocoele collapse on the cryosurvival of in vitro produced porcine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 61, No 6.
- Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology* 2012;77(3):467-82.
- Bogliolo L, Murrone O, Piccinini M, Ariu F, Ledda S, Tilocca S, Albertini DF. Evaluation of the impact of vitrification on the actin cytoskeleton of in vitro matured ovine oocytes by means of Raman microspectroscopy *J Assist Reprod Genet.* 2015 Feb;32(2):185-93
- Borini A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C, Coticchio G. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2006; 21: 512-7.

- Chamayou S., Bonaventura G., Alecci C., Tibullo D., Di Raimondo F., Guglielmino A., Barcellona M.L.. Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on niRNA content. *Cryobiology*. 2011. 62:130 — 134
- Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN & Yang YS 2001 Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reproduction* 16 2350–2356.
- Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Buckett WM & Tan SL 2005 High survival rates and regnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertility and Sterility* 84 S36.
- Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*. 2011 Aug;96(2):277-85.
- Cocero M.J., Moreno Diaz de la Espiña S., Aguilar B. Ultrastructural characteristic of fresh and frozen thawed ovine embryos using two cryoprotectants. *Biol. Reprod.* 66, 1244-1258 (2002).
- Comizzoli P, Holt WV. Recent advances and prospects in germplasm preservation of rare and endangered species. *Adv Exp Med Biol*. 2014;753:331-56.
- Crowe JH, Crowe LM, Wolkers WF, Oliver AE, Ma X, Auh J-H, Tang M, Zhu S, Norris J, Tablin F. Stabilization of dry mammalian cells: Lessons from nature. *Integr Comp Biol* 2005;45 (5):810-820.

- Curaba M, Poels J, Langendonck A, van, Donnez J, Wyns C. Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification? *Fertil Steril* 2011a;95:2123.
- Curaba M, Verleysen M, Amorim CA, Dolmans M-M, Van Langendonck A, Hovatta O, Wyns C, Donnez J. Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by vitrification. *Fertil Steril* 2011b;95:1229–1234.
- Das ZC, Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Lyophilized somatic cells direct embryonic development after whole cell intracytoplasmic injection into pig oocytes. *Cryobiology* 2010;61 (2):220-224.
- Devi L, Makala H, Pothana L, Nirmalkar K. Comparative efficacies of six different media for cryopreservation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) calf testis. *Reprod Fertil Dev* 2014;28(7):872–885.
- Donnez J, Silber S, Andersen CY, Demeestere I, Piver P, Meirou D, Pellicer A, Dolmans MM. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births. *Ann Med.* 2011;43:437–50.
- Dos Santos Neto P.C., Vilariño M., Barrera N., Cuadro F., Crispo B., Menchaca A. Cryotolerance of Day 2 or Day 6 in vitro produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods. *Cryobiology* 70, 17–22 (2015).
- Dumont L, Arkoun B, Jumeau F, Milazzo J-P, Bironneau A, Liot D, Wils J, Rondanino C, Rives N. Assessment of the optimal vitrification protocol for pre-pubertal mice testes leading to successful in vitro production of flagellated spermatozoa. *Andrology* 2015;3:611–625.

- Eisenhauer KM, Gerstein RM, Chiu CP, Conti M, Hsueh AJ. 1997. Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biol Reprod* 56:1120–1125.
- Eroglu A, Elliott G, Wright DL et al. 2005 Progressive elimination of microinjected trehalose during mouse embryonic development. *Reproductive BioMedicine Online* 10, 503–510.
- Frederickx V, Michiels A, Goossens E, De Block G, VanSteirteghem AC, Tournaye H. Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen-thawed mouse germ cells. *Hum Reprod* 2004;19:948–953.
- Gao D, Mazur P, Critser JK. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow AM, Critser JK (eds.), *Reproductive Tissue Banking*. San Diego: Academic Press, 1997;263-327.
- Garcia A1, Gil L1, Malo C2, Martinez F1, Kershaw-Young C3, de Blas I4. Effect of different disaccharides on the integrity and fertilising ability of freeze-dried boar spermatozoa: a preliminary study. *Cryo Letters* 2014;35(4):277-85.
- Gianaroli L, Magli MC, Stanghellini I, Crippa A, Crivello AM, Pescatori ES, Ferraretti AP. DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2012;97(5):1067-1073.
- Gil L, Olaciregui M, Luño V, Malo C, González N, Martínez F. Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm. *Reprod Domest Anim* 2014;49 Suppl 4:72-81.
- Goodrich RP, Sowemimo-Coker SO, Zerez CR, Tanaka KR. Preservation of metabolic activity in lyophilized human erythrocytes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992;89 (3):967-971.

- Greider CW, Blackburn EH. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43(2 Pt 1):405–413.
- Guo N, Puhlev I, Brown DR, Mansbridge J, Levine F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nat Biotechnol* 2000;18 (2):168-171.
- H.R. Tervit, D.G. Whittingham, L.E. Rowson, Successful culture in vitro of sheep and cattle ova, *J. Reprod. Fertil.* 30 (1972) 493–497.
- Habibi A., Farrokhi N., Moreira da Silva F., Bettencourt B.F., BrugesArmas J., Amidi F., Hosseini A.. The effects of vitrification on gene expression in mature mouse oocytes by nested quantitative PCR. *i Assist Reprod Genet.* 2010. Nov;27(11):599604. doi: 10.1007/s1081501094530. Epub 2010 AL12 17.
- Hara H, Abdalla H, Morita H, Kuwayama M, Hirabayashi M, Hochi S. Procedure for bovine ICSI, not sperm freeze-drying, impairs the function of the microtubule-organizing center. *J Reprod Dev* 2011; 57(3):428-32.
- Hara H, Tagiri M, Hirabayashi M, Hochi S. Effect of cake collapse on the integrity of freeze-dried bull spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2013;26 (1):144 (Abstract).
- Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y, Valli H, Rodriguez M, Ezzelarab M, Dargo G. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell* 2012;11:715–726.
- Hirabayashi M, Kato M, Ito J, Hochi S. Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote* 2005; 13 (1):79-85.

- Hochi S, Watanabe K, Kato M, Hirabayashi M. Live rats resulting from injection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year. *Mol Reprod Dev* 2008;75 (5):890-894.
- Ishimori H, Saeki K, Inai M et al. 1993 Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology* 40, 427–433.
- Ishimori H, Takahashi Y, Kanagawa H 1992a Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. *Theriogenology* 37, 481–487
- Ishimori H, Takahashi Y, Kanagawa H 1992b Factors affecting survival of mouse blastocysts vitrified by a mixture of ethylene glycol and dimethylsulfoxide. *Theriogenology* 38, 1175–1185.
- Izadyar F, Den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, De Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine Type A spermatogonia during long-term culture. *Biol Reprod* 2002a;68:272–281.
- Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt JJ, den Ouden K, Creemers LB, Woelders H, de Rooij DG. Development of a cryopreservation protocol for Type A spermatogonia. *J Androl* 2002b;23:537–545.
- Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD, Schlatt S. Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. *Hum Reprod* 2007;22:1060–1067.
- Jahnukainen K, Ehmcke J, Nurmio M, Schlatt S. Autologous ectopic grafting of cryopreserved testicular tissue preserves the fertility of prepubescent monkeys that receive sterilizing cytotoxic therapy. *Cancer Res* 2012;72:5174–5178
- Jain JK, Paulson RJ. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2006

Oct;86(4Suppl):1037-46.

- Kaneko H, Kikuchi K, Nakai M, Somfai T, Noguchi J, Tanihara F, Ito J, Kashiwazaki N. Generation of live piglets for the first time using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. PLoS One 2013;8: e70989.
- Kaneko H, Kikuchi K, Tanihara F, Noguchi J, Nakai M, Ito J, Kashiwazaki N. Normal reproductive development of pigs produced using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. Theriogenology 2014;82:325–331.
- Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. Biomaterials 1996;17:243–256.
- Kazuo Saito, M.D.1 Kotaro Suzuki, M.D.1 Akira Iwasaki, M.D.2 Yasushi Yumura, M.D.3 Yoshinobu Kubota, M.D.3. Sperm Cryopreservation before Cancer Chemotherapy Helps in the Emotional Battle against Cancer. American Cancer Society Volume 104, Issue 3, Version of Record online: 20 JUN 2005.
- Keros V, Hultenby K, Borgstrom B, Fridstrom M, Jahnukainen K, Hovatta O. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. Hum Reprod 2007; 22:1384–1395.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 266:2011–2015.

- Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum Reprod* 2008;23 (2):233-239.
- Kuwayama M & Kato O 2000 All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 17:477 (abstract).
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S & Kato O 2005 Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive Biomedicine Online* 11 608–614.
- Kvist K, Thorup J, Byskov AG, Hoyer PE, Mollgard K, Yding Andersen C. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Hum Reprod* 2006;21:484–491.
- Kwon IK, Park KE, Niwa K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 2004;71 (5):1430-1436.
- Lane M., Scholcraft W.B., Gardener D.K. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 72: 1073-1078.
- Lee R.K., Li S.H., Lu C.H., Ho H.Y., Chen Y.J., Yeh F1.1. Abnormally low expression of connexin 37 and connexin 43 in subcutaneously transplanted cryopreserved mouse ovarian tissue. *Assisi Reprod Genet.* 2008. Sep/Oct,25(9 1 0):48997. doi: 10.1007/x1081500892648. Epub 2008 Oct 21.
- Leoni GG, Berlinguer F, Succu S, Bebbere D, Mossa F, Madeddu M, Ledda S, Bogliolo L, Naitana S. A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to



predict their transfer into recipients. *Molecular Reproduction and Development*. 75:373–382 (2008).

- Levi Setti PE, Albani E, Novara PV, Cesana A, Morreale G. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* 2006; 21: 370-5.
- Li S, Chakraborty N, Borcar A, Menze MA, Toner M, Hand SC. Late embryogenesis abundant proteins protect human hepatoma cells during acute desiccation. *Proc Nat Acad Sci USA* 2012;109 (51):20859-20864.
- Liu H.C., He Z., Rosenwaks Z. Mouse ovarian tissue cryopreservation has only a minor effect on in vitro follicular maturation and gene expression. *J Assist Reprod Genet*. 2003. Oct;20(10):42131.
- Liu JL1, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R, Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi R, Yang X. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod*. 2004;70(6):1776-81.
- Loi P, Matsukawa K, Ptak G, Clinton M, Fulka Jr. J, Natan Y, Arav A. Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. *PLoS ONE* 2008;3 (8):e2978.
- Magalhães MJ Jr, Martins LF, Senra RL, Santos TF, Okano DS, Pereira PR, Faria-Campos A, Campos SV, Guimarães JD, Baracat-Pereira MC. Differential abundances of four forms of Binder of Sperm in the seminal plasma of *Bos taurus indicus* bulls with different patterns of semen freezability. *Theriogenology* 2016;86(3):766-777.
- Martins CF, Bao SN, Dode MN, Correa GA, Rumpf R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and

fertilizing ability of bovine sperm. *Theriogenology* 2007; 67 (8):1307-1315.

- Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals* 2001 Apr; 36(2):49-55.
- Massip A. Review Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. *Reprod Dom Anim* 36, 49–55 (2001) Ó 2001 Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin ISSN 0936-6768.
- Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *The Journal of General Physiology* 1963; 47:347–369.
- Mazur P. Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. *Orif Life*, 1980;10:137-59.
- Mazur P. Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. *Orif Life*, 1980;10:137-59.
- Mazur P., Seki S, Pinn I.L., Kleinhans F.W., Edashige. Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes. Received 28 January 2005; accepted 14 April 2005 Available online 21 June 2005. *Cryobiology* 51 (2005) 29–53.
- Mazur P.: Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys.* 1990;17:53–92 Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN 3 7831-8077
- Meryman HT, Kafig E. Survival of spermatozoa following drying. *Nature* 1959;184 (4684):470-471.
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA. 1997. hEST2, the putative

human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785–795.

- Milazzo JP, Travers A, Bironneau A, Safsaf A, Gruel E, Arnoult C, Macé B, Boyer O, Rives N. Rapid screening of cryopreservation protocols for murine prepubertal testicular tissue by histology and PCNA immunostaining. *J Androl* 2010;31: 617–630.
- Moisan AE, Leibo SP, Lynn JW, Gómez MC, Pope CE, Dresser BL, Godke RA. Embryonic development of felid oocytes injected with freeze-dried or air-dried spermatozoa. *Cryobiology* 2005;51:373 (abstract).
- Naitana S., Dattena M., Gallus M., Loi P., Branca A., Ledda S., Cappai P. Recipient synchronization affects viability of vitrified ovine blastocyst. *Theriogenology* 43, 1371-1378 (1995)
- Natan D, Nagler A, Arav A. Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation. *PLoS ONE* 2009;4 (4):e5240.
- Nugent D, Meirow D, Brook PF, Aubard Y, Gosden RG. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum Reprod Update* 1997;3:267–280
- Olaciregui M, Luño V, Gonzalez N, De Blas I, Gil L. Freeze-dried dog sperm: Dynamics of DNA integrity. *Cryobiology* 2015;71 (2):286-290.
- Onofre J., Y. Baert et al.2016: Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Human Reproduction Update*, Vol.22, No.6 pp. 744–761, 2016

- Pacchiarotti J, Ramos T, Howerton K, Greilach S, Zaragoza K, Olmstead M, Izadyar F. Developing a clinical-grade cryopreservation protocol for human testicular tissue and cells. *Biomed Res Int* 2013;2013:930–962.
- Pegg, David E. (January 1, 2007). "Principles of cryopreservation". *Methods in Molecular Biology*. Clifton, N.J. 368: 39–57 Received September 25, 1989; Accepted December 29, 1989
- Poels J, Abou-Ghannam G, Herman S, Van Langendonck A, Wese F-X, Wyns C. In search of better spermatogonial preservation by supplementation of cryopreserved human immature testicular tissue xenografts with N-acetylcysteine and testosterone. *Front Surg* 2014;1:47.
- Poels J, Van Langendonck A, Many M-C, Wese F-X, Wyns C. Vitrification preserves proliferation capacity in human spermatogonia. *Hum Reprod* 2013;28: 578–589.
- Portmann M, Nagy ZP & Behr B 2010 Evaluation of blastocyst survival following vitrification/warming using two different closed carrier systems. *Human Reproduction* 25 i261.
- Pothana L, Makala H, Devi L, Varma VP, Goel S. Germ cell differentiation in cryopreserved, immature, Indian spotted mouse deer (*Moschiola indica*) testes xenografted onto mice. *Theriogenology* 2015;83:625–633
- Pugh P.A., Tervit H.R., Nieman H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw dilution, in vitro and in vivo flowing transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 58, 9-22 (2000)

- Pukazhenthil BS, Nagashima J, Travis AJ, Costa GM, Escobar EN, França LR, Wildt DE. Slow Freezing, but Not Vitrification Supports Complete Spermatogenesis in
- Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313:573-5.
- Revel A., Shoshana Revel-Vilk 2008: Pediatric fertility preservation: Is it time to offer testicular tissue cryopreservation? *Molecular and Cellular Endocrinology* 282 (2008) 143–149
- Rizos D., Lonergan P , Boland M P., Arroyo Garcia R., Pintado B. de la Fuente J., Gutiérrez Adan A. Analysis of differential messenger le RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture system, implications for blastocyst quality. *Biol Reprod.* 2002. March,66(3):58995.
- Romão R., Marques C.C., Bettencourt E., Rosa M.L.N. Pereira R.M.L.N. Cryopreservation of Sheep Produced Embryos – Current and Future Perspectives. 2016. *Veterinary Medicine and Science*»*"Insights from Animal Reproduction"*, *book edited by Rita Payan Carreira, ISBN 978-953-51-2268-5,*
- Sá R, Cremades N, Malheiro I, Sousa M. Cryopreservation of human testicular diploid germ cell suspensions. *Andrologia* 2012;44:366–372.
- Sambu S (June 25, 2015). A Bayesian approach to optimizing cryopreservation protocols. *PeerJ.* 3: e1039
- Santos RR, Amorim C, Cecconi S, Fassbender M, Imhof M, Lornage J, Paris M, Schoenfeldt V, Martinez-Madrid B. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Anim Reprod Sci.* 2010 Dec;122(3-4):151-63.

- Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A. Do physical forces contribute to cryodamage? *Biotechnol Bioeng* 2009;104(4):719-28.
- Saragusty J., Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* (2011) 141 1–19.
- Sato T, Katagiri K, Kubota Y, Ogawa T. In vitro sperm production from mouse spermatogonial stem cell lines using an organ culture method. *Nat Protoc* 2013;8: 2098–3104.
- Schlatt S, Kim SS, Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction* 2002;124:339–346.
- Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med* 2015;61(1):1-12.
- Shaw JM, Kola I, MacFarlane DR, Trounson AO, 1991: An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J Reprod Fertil* 91, 9–18.
- Sherman JK. Freezing and freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1954; 5 (4):357-371.
- Sherman JK. Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. *Fertil Steril* 1963;14 (1):49-64.
- Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, Kurome M, Nagashima H, Toyokuni S, Kogishi K. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature

testicular pieces and in vitro microinsemination. Hum Reprod 2002;17:3039–3045.

- Shirazi A, Soleimani M, Karimi M, Nazari H, Ahmadi E, Heidari B. Vitrification of invitro produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. Cryobiology. 2010;60:204–210
- Sitaula R, Fowler A, Toner M, Bhowmick S. A study of the effect of sorbitol on osmotic tolerance during partial desiccation of bovine sperm. Cryobiology 2010;60(3):331-6.
- Sonesson AK, Goddard ME, Meuwissen THE, 2002: The use of frozen semen to minimize inbreeding in small populations. Genet Res 80, 27–30.
- Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. Reprod Biomed Online 2004; 9: 152-63.
- Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, Rall WF, Pitt RE, Lin TT, MacIntyre RJ. Cryopreservation of Drosophila melanogaster embryos. Nature. 1990 May 10;345(6271):170-2.
- Succu S., Bebbere D., Bogliolo L., Ariu F., Fois S., Leoni G.G., Berlinguer F., Naitana S., Ledda S.. Vitrification of in vitro matured ovine oocytes affects in vitro preimplantation development and mRNA abundance. Mol Reprod Dev. 2008. Mar;75(3):53846.
- Succu S., Pasciu V., Manca M.E., Chelucci S., Torres-Rovira L., Leoni G.G, Zinellu A., Carru C., Naitana S., Berlinguer F. Dose-dependent effect of melatonin on postwarming development of vitrified ovine embryos . Theriogenology (2014).

- Tahereh Talaei Ph.D., Tahereh Esmaeelpour Ph.D., Fatemeh Aekiyash B.Sc., Soghra Bahmanpour. Effects of cryopreservation on plasma membrane glycoconjugates of human spermatozoa Iranian Journal of Reproductive Medicine Vol.8. No.3. pp: 119-124, Summer 2010
- Travers A, Milazzo JP, Perdrix A, Metton C, Bironneau A, Macé B, Rives N. Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. Theriogenology 2011;76:981–990.
- Trounson A., Peura A., Kirby C. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. Fertility and Sterility 1987; 48, 843–850
- Trounson A., Sjoblom P. Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. Fertility and Sterility 1988; 50, 373–376.
- Turathum R.. Ktilnasan Saikliun, Parisatcha Sangsuwan, and Yindee Kitiyanant. Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. Reprod BiolEndocrinol. 2010. 8: 70. Published online 2010 Jun 22. doi: 10.1186:14777827870.
- Unni S, Kasiviswanathan S, D'Souza S, Khavale S, Mukherjee S, Patwardhan S, Bhartiya D. Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant. Fertil Steril. 2012 Jan;97(1):200-8.
- Vajta G, Holm P, Greve T & Callesen H 1997 Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. Acta Veterinaria Scandinavica 38 349–352.
- Vajta G, Holm P., Greve T., Callesen H. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and



direct in straw rehydratation. Anim. Reprod. Sci. 45, 191-200 (1996)

- Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. Reprod Biomed Online. 2006;12:779–96.
- Vajta G., Holm P., Kuwayama M. et al. Open pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Molecular Reproduction and Development 1998; 51: 53-8.
- Vajta G., Nagy Z.P. Review Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory Review on vitrifi cation. Vol 12 No 6. 2006 779–796 Reproductive BioMedicine Online; [www.rbmonline.com/Article/2209](http://www.rbmonline.com/Article/2209) on web 11 April 2006.
- Vajta G., Nagy Z.P. Review Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory Review on vitrifi cation. Vol 12 No 6. 2006 779–796 Reproductive BioMedicine Online; [www.rbmonline.com/Article/2209](http://www.rbmonline.com/Article/2209) on web 11 April 2006.
- Valojerdi M.R. et al. 2009: Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. J Assist Reprod Genet (2009) 26:347–354
- Vincent C, Pruliere G, Pajot-Augy E et al. Effects of cryoprotectants on action filaments during cryopreservation of one-cell rabbit embryos. Cryobiology 1990; 27: 9-23.
- Vincent C, Pruliere G, Pajot-Augy E et al. Effects of cryoprotectants on action filaments during cryopreservation of one-cell rabbit embryos. Cryobiology 1990; 27: 9-23.

- Vincent C., Pruliere G., Pajot-Augy E. et al. Effects of cryoprotectants on action filaments during cryopreservation of one-cell rabbit embryos. *Cryobiology* 1990; 27: 9-23.
- Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol.* 1998; 16(7):639-41.
- Walker S.K., J.L. Hill, D.O. Kleemann, C.D. Nancarrow, Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations, *Biol. Reprod.* 55 (1996) 703–708
- Wang X1, Hua TC, Sun DW, Liu B, Yang G, Cao Y. Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me2SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. *Cryobiology.* 2007 Aug;55(1):60-5. Epub 2007 Jun 9.
- Watanabe H, Asano T, Abe Y, Fukui Y, Suzuki H. Pronuclear formation of freeze-dried canine spermatozoa microinjected into mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26 (9-10):531-536
- Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, Moor RM. Deep freezing of sheep embryos. *J Reprod Fertil* 1976;46:151–4
- Wrenzycki C., Herrmann D., Carnwath J.W., Niemann H.. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev.* 1999. May,53(1):818.
- Wrenzycki C., Wells D., Herrmann D., Miller A., Oliver J., Tervit R., Niemann H.. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod.* 2001. Jul;65(1):30917

- Wyns C, Curaba M, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A, François-Xavier W, Donnez J. Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. *Hum Reprod* 2007;22:1603–1611.
- Xing-ling Wang & Xiao Zhang & Yao-qin Qin & Da-yong Hao & Hui-rong Shi, 2012 Outcomes of day 3 embryo transfer with vitrification using Cryoleaf: a 3-year follow-up study. *J Assist Reprod Genet* (2012) 29:883–889.
- Yavin S & Arav A 2007 Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 67 81–89. (doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.029).
- Yavin S, Aroyo A, Roth Z & Arav A 2009 Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Human Reproduction* 24 797–804. (doi:10.1093/humrep/den397).
- Yildiz C, Mullen B, Jarvi K, McKerlie C, Lo KC. Effect of different cryoprotectant agents on spermatogenesis efficiency in cryopreserved and grafted neonatal mouse testicular tissue. *Cryobiology* 2013;67:70–75.
- Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun* 2014;5:4320.
- Youm J, Kim SK, Jee BC, Kim SH. Embryonic survival, development and cryoinjury of repeatedly vitrified mouse

preimplantation embryos. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2017 Oct;217:66-70. doi: 10.1016/j.ejogrb.2017.08.027.