

Università degli Studi di Napoli

Federico II



Dottorato di Ricerca in Scienze Filosofiche

XXX Ciclo

**Aspetti bioetici della riproduzione assistita: effetti sulla salute
dei nati e nuovi approcci per la preservazione della fertilità
femminile**

Tutor

Ch.mo Prof. Roberto Gualtieri

Candidata:

Dott.ssa Anna Merolla

Coordinatore

Ch.mo Prof. Edoardo Massimilla

INDICE

INTRODUZIONE.....	5
Bioetica della Riproduzione Assistita	6
Il progresso delle ART	9
Stress ossidativo e infertilità	11
<i>In vivo</i>	13
<i>In vitro</i>	23
Stress ossidativo e cellule germinali maschili	42
Prevenzione della fertilità in pazienti oncologiche	48
<i>Le terapie farmacologiche</i>	54
Parte sperimentale	55
MATERIALI E METODI	59
Spermiogramma	59
<i>Camera di Bürker</i>	61
<i>Camera di Makler</i>	62
<i>Sperm Class Analyzer (SCA)</i>	63
Microscopio Confocale a Scansione Laser (CSLM).....	69
Effetti della temperatura su spermatozoi umani	73
<i>Effetti della temperatura sulla cinetica</i>	73
<i>Effetti della temperatura sulla vitalità</i>	73
<i>Effetti della temperatura sulla frammentazione genomica</i>	74
<i>Osservazione al Microscopio Confocale</i>	76
Effetti della temperatura su spermatozoi umani dopo procedure di swim up	76

<i>Effetti della temperatura sulla cinetica, sulla vitalità e sulla frammentazione genomica dopo procedure di swim up</i>	77
Effetti della concentrazione su spermatozoi umani	78
<i>Effetti della concentrazione sulla cinetica, sulla vitalità e sulla frammentazione genomica</i>	78
Effetti del pretrattamento con antiossidanti e, successiva, induzione dello stress ossidativo esogeno su spermatozoi nel modello bovino.....	79
<i>Antiossidanti</i>	79
<i>Agente ossidante</i>	80
<i>Preparazione dei campioni</i>	81
<i>Effetto del pretrattamento con antiossidanti e, successiva, induzione dello stress ossidativo esogeno sulla cinetica e sulla frammentazione genomica</i>	81
Effetti sulla qualità degli embrioni ottenuti da fecondazione con spermatozoi pretrattati con antiossidanti e sottoposti, successivamente, a stress ossidativo esogeno nel modello bovino.....	82
<i>Fecondazione dei gameti bovini</i>	82
<i>Effetto sullo sviluppo embrionale</i>	83
<i>Effetto sulla frammentazione genomica della blastocisti</i>	84
Effetto dell'inibizione della via di segnalazione PI3K/PTEN/Akt contro i danni indotti da chemioterapici, sulla salute follicolare nel modello murino	85
<i>Chemioterapico cisplatino</i>	85
<i>Inibitore della serina/tronina chinasi Akt</i>	85
<i>Coltura dei frammenti ovarici</i>	86
<i>Colorazione con Trypan blue</i>	86

<i>Conta cellulare</i>	86
Analisi statistica dei dati.....	86
RISULTATI PARTE SCIENTIFICA	88
Effetto della temperatura su spermatozoi umani.....	88
<i>Effetto della temperatura sulla cinetica spermatica</i>	88
<i>Effetto della temperatura su vitalità e frammentazione del DNA</i>	89
Effetto della temperatura su spermatozoi umani dopo la procedura di	91
swim up.....	91
<i>Effetto della temperatura sulla cinetica spermatica dopo la procedura di swim up</i> .	91
<i>Effetto della temperatura su vitalità e frammentazione del DNA dopo procedura di swim up</i>	93
Effetto della concentrazione su spermatozoi umani.....	95
<i>Effetto della concentrazione sulla cinetica spermatica</i>	95
<i>Effetto della concentrazione su vitalità e frammentazione del DNA</i>	96
Effetto del pretrattamento con antiossidanti e, successiva, induzione dello stress ossidativo esogeno su spermatozoi nel modello bovino.....	98
<i>Effetto del pretrattamento con antiossidanti e, successiva, induzione dello stress ossidativo esogeno sulla cinetica spermatica</i>	98
<i>Effetto degli antiossidanti sulla frammentazione del DNA spermatico</i>	100
Effetti sulla qualità degli embrioni ottenuti da fecondazione con spermatozoi pretrattati con antiossidanti e sottoposti, successivamente, a stress ossidativo esogeno nel modello bovino	102
<i>Fecondazione in vitro e coltura embrionale</i>	102
<i>Numero medio di cellule in blastocisti</i>	104

<i>Effetto degli antiossidanti sulla frammentazione del DNA in blastocisti.....</i>	105
Effetto dell'inibizione della via di segnalazione PI3K/PTEN/Akt contro i danni indotti da chemioterapici, sulla salute follicolare nel modello murino	107
DISCUSSIONE.....	109
Parte sperimentale I.....	119
Parte sperimentale II.....	124
Parte sperimentale III	128
Nuove frontiere e le relative implicazioni etiche	131
BIBLIOGRAFIA.....	140

INTRODUZIONE

L'infertilità è considerata dall' Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) una patologia. Per infertilità si intende l'assenza di concepimento dopo 12, o più, mesi di rapporti mirati non protetti. Ci sono differenti fattori patologici responsabili di tale malattia, disfunzioni dell'apparato riproduttivo e fattori ambientali possono compromettere la salute riproduttiva agendo a vari livelli.

Dati recenti dell'Istituto Superiore di Sanità mostrano che le cause di infertilità sono per il 30-50% di origine femminile, per il 30-35% di origine maschile, per circa il 10% di coppia ed ancora per un 20-30% non hanno un'origine diagnosticabile (forme idiopatiche) (fig.1).

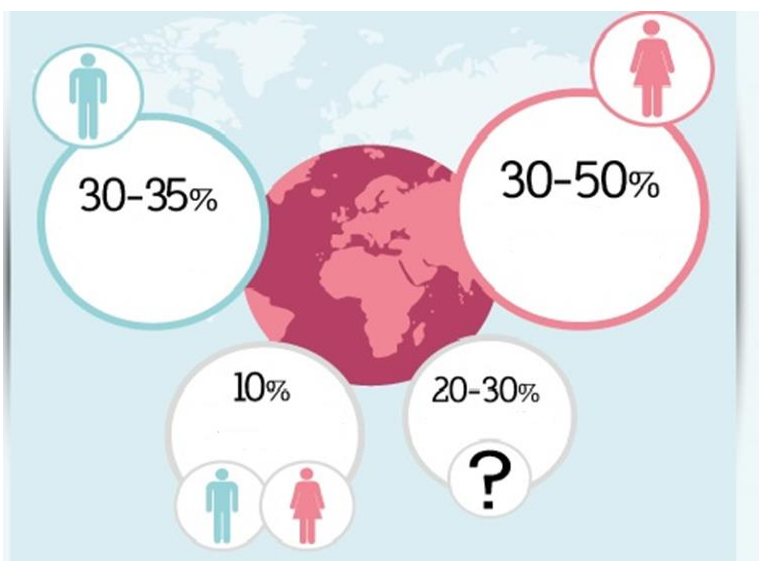


Figura 1: Distribuzione delle cause di infertilità

Le strategie di trattamento della infertilità prevedono un programma terapeutico mirato in funzione della causa da rimuovere. Nel caso in cui, come spesso accade, tale programma non risolve il problema si ricorre alle tecnologie di riproduzione assistita. Dal loro primo utilizzo clinico a oggi, si contano circa cinque milioni di nascite da riproduzione assistita nel mondo e tale numero è in continuo aumento (Centri per il Controllo e la Prevenzione delle malattie, 2012).

Nonostante l'obiettivo cui tendono le pratiche ART (Assisted Reproductive Technologies) sia in generale benefico, permettendo la genitorialità a coppie che non hanno possibilità di concepire naturalmente, esse presentano implicazioni bioetiche piuttosto controverse poiché vengono ad intrecciarsi non solo questioni biomediche e giuridiche ma anche morali e sociali.

Bioetica della Riproduzione Assistita

Il paesaggio della salute riproduttiva è cambiato per sempre nel 1978 con la nascita di Louise Brown, *'the world's first test tube baby'* (Steptoe et al., 1978).

L'introduzione della fecondazione *in vitro* (IVF, *in vitro* fertilization) e, con essa la capacità di modificare ciò che in passato era stato un processo biologico piuttosto "oscuro", ha portato sia controversie sociali, etiche e legali, che alla felicità e compimento del senso della vita per milioni di individui e coppie. I principi bioetici di base di *autonomia, beneficio, giustizia e non maleficenza*, sanciti da Beauchamp e Childress sono i pilastri su cui le società professionali nel campo della biomedicina riproduttiva hanno sviluppato le linee guida raccomandate (Van Voorhis et al., 2010).

Questi principi, anche se fondamentali per la protezione di tutte le parti coinvolte, sono spesso difficili da conciliare con l'inarrestabile avanzamento scientifico che andrebbe accompagnato dall'incremento delle esigenze sociali e quadri giuridici specifici.

La bioetica nasce nel 1970 quando van Renselaer Potter pubblica un articolo intitolato "Bioethics: the Science of Survival", nell'edizione del 1978 della "Encyclopedia of Bioethics", poi, viene riportata, dal curatore Warren Thomas Reich, la prima definizione: "La bioetica è lo studio sistematico della condotta umana nell'ambito della scienza della vita e della cura della salute, in quanto questa condotta è esaminata alla luce dei valori morali e dei principi".

La bioetica è, dunque, lo studio delle questioni etiche che emergono nelle scienze sanitarie e biologiche. Essa include lo studio delle questioni sociali, legali ed economiche legate a tali problemi etici (Serour et al., 2014).

La bioetica viene, in conclusione, definita dall'OMS il campo d'indagine che esamina problemi etici e i dilemmi derivanti da salute, assistenza sanitaria e ricerca che coinvolgono gli esseri umani (WHO). Anche se l'etica può sembrare una disciplina interamente accademica, nel campo dell'infertilità e in particolare delle ART, la bioetica ha un'immediata rilevanza per tutti i pazienti e le donne che desiderano avere un bambino. Essendo tale ambito veramente delicato si pongono mille quesiti ai quali, con il tempo, bisogna dare una risposta. Come dovremmo gestire le richieste difficili e insolite? Che politica dovremmo adottare? Come dobbiamo equilibrare la giustizia, l'utilità e l'equità? Come dobbiamo bilanciare i diritti della donna e il benessere del futuro figlio? Come dobbiamo bilanciare i diritti dei pazienti e le obiezioni di coscienza del medico?

Le tecnologie di riproduzione assistita hanno permesso il coinvolgimento di terze parti nel processo di riproduzione, in termini di donazione di ovociti, spermatozoi o embrioni o, più recentemente, nella disponibilità di altre donne a portare avanti la gravidanza di embrioni appartenenti a coppie in cui la partner femminile non è in grado di supportarla (Braannstroom et al., 2015). Ciò rende ancor più complessa la situazione poiché, alle necessità e diritti del nato e dei genitori si aggiungono quelli del “donatore” o della donna che ha portato avanti la gravidanza e dato luogo alla nascita di un figlio per altri. Le ART hanno aperto anche la strada ad altre pratiche, tra cui la selezione del genere, la diagnosi pre-impianto (PGD), lo screening genetico pre-impianto, la manipolazione genetica, la crioconservazione di gameti, embrioni e gonadi, il trapianto gonadico e la clonazione. Queste possibilità aperte dalla scienza e dall’ART hanno sconvolto la precedente percezione della riproduzione e provocato, quindi, un forte dibattito etico. I quattro principi etici fondamentali, già citati in precedenza, quali *autonomia*, *giustizia*, *beneficenza* e *non maleficenza* non sono del tutto adeguati alle questioni etiche nelle ART. L’UNESCO ha ampliato i quattro principi etici a 15 (Articoli 3 e 17) e li ha collegati ai diritti umani nella “dichiarazione universale sulla bioetica e sui diritti dell’uomo” adottati dagli Stati membri delle Nazioni Unite. Le società si differenziano per la loro pratica di bioetica medica basata su differenze sociali, culturali, economiche, religiose e legali. Possono naturalmente esserci controversie tra le giurisdizioni e le leggi nei determinati paesi. Ciò che è eticamente accettabile non è sempre giuridicamente percorribile e ciò che è legalmente accettabile non è sempre eticamente ammissibile.

Tuttavia, oltre alle problematiche su menzionate ed ampiamente dibattute anche se assolutamente non risolte, un tema ampiamente affrontato dalla comunità scientifica,

ma sottovalutato dai media, è rappresentato dalla possibilità che le tecnologie di riproduzione assistita possano comportare l'insorgenza di disordini e complicazioni relative alla salute dei bambini nati; in merito a ciò si viene a creare il dibattito circa quanto sia giusto realizzare il desiderio procreativo di una coppia a discapito della salute del nato. Tali procedure sono basate sul pre-trattamento /manipolazione dei gameti al di fuori del loro ambiente naturale per facilitare il processo di fecondazione; per questi motivi il tasso di successo delle ART ha attirato molta attenzione per la possibilità d'induzione di danni iatrogeni a gameti ed embrioni. Attualmente, studi scientifici hanno mostrato che tali danni possono mostrare le loro conseguenze negative, non solo in età neonatale ma anche, molto più drammaticamente, negli adolescenti ed addirittura nell'adulto.

Le ART rappresentano dunque, sicuramente, una prospettiva terapeutica molto valida ma, contestualmente, c'è una forte necessità di comprendere la possibile influenza dei molteplici fattori ai quali sono esposti gameti ed embrioni sulla salute a breve ed a lungo termine dell'embrione stesso e dei nati.

Il progresso delle ART

Come già detto, nel 1978 nasce Louise Brown, la prima bambina concepita *in vitro*. Da allora, l'innovazione e la ricerca hanno portato a numerose nuove metodiche e strumentazioni che hanno reso la parte biologica della riproduzione assistita una disciplina in continua evoluzione. Numerosi sono stati i progressi nel corso di questi anni sia nelle metodiche che nei mezzi e tempi di coltura utilizzati per i gameti e per gli embrioni. Alla comparsa di nuove tecniche come l'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) si sono affiancate nuove metodologie di prelievo e coltura

dei gameti. Si è passati dal facilitare la fecondazione mettendo insieme in coltura ovociti e spermatozoi, opportunamente selezionati, a introdurre, direttamente, un singolo spermatozoo nel citoplasma ovocitario. Si sono evolute, ancora, tecniche per la crioconservazione dei gameti e degli embrioni e metodi per il prelievo degli spermatozoi, non più dall'eiaculato ma direttamente dal testicolo o dall'epididimo. Inoltre, va considerato che uno stesso obiettivo, quale ad esempio la crioconservazione di gameti ed embrioni, può essere raggiunto attraverso metodiche diverse che potrebbero influenzare in modo differente la salute dei concepiti.

Le tecnologie di riproduzione assistita sono, comunque, piuttosto recenti e, come evidenziato in precedenza, soggette a numerosi cambiamenti i cui effetti a breve e, soprattutto, a lungo termine sono ancora poco chiari o addirittura sconosciuti. Il timore, dunque, che le tecniche di fecondazione assistita facciano sorgere un maggior numero di complicazioni nei feti ha basi teoriche fondate e dipende da un'enorme variabilità di fattori. Tali fattori potrebbero essere ricercati nelle condizioni mediche associate all'infertilità o sub-fertilità genitoriale o anche nelle condizioni laboratoriali quali:

cambiamenti di temperatura a cui sono esposti gli embrioni, composizione chimica dei mezzi di coltura, metodiche di selezione e trattamento dei gameti, metodologie diverse di crioconservazione e scongelamento, differenze nella qualità e stadio di maturazione dei gameti stessi, dipendenti dal fatto che gli spermatozoi possano provenire dall'eiaculato o essere estratti dal testicolo, o, per quanto riguarda gli ovociti, dall'utilizzo di ovociti maturi oppure sottoposti a maturazione *in vitro* in mezzi di coltura chimicamente diversi.

Tutti questi elementi potrebbero riflettersi in effetti a breve termine quali ad esempio le alterazioni dell'impianto o dello sviluppo dell'embrione, o anche a lungo termine causando anomalie nei nati in età pediatrica o addirittura in età adulta.

Sono state, sin ora, svolte numerose ricerche clinico-statistiche di "follow up" ma i risultati di tali ricerche spesso risultano non chiari. Per una valutazione statistica affidabile si dovrebbero confrontare le caratteristiche neonatali, pediatriche e puberali, di popolazioni concepite mediante ART rispetto ai concepiti naturalmente, tenendo conto del periodo e del luogo in cui avvengono le nascite, e tutto questo risulta piuttosto complesso. Ancora più complesso risulta assicurare una perfetta omogeneità della popolazione di concepiti *in vitro* da un punto di vista delle numerose variabili a cui si è accennato. Ad esempio se si vogliono seguire le possibili conseguenze negative della vitrificazione ovocitaria sulla salute dei nati, occorre selezionare coppie con caratteristiche simili da un punto di vista di infertilità, protocolli di stimolazione della crescita follicolare, mezzi e tempi di coltura utilizzati per spermatozoi, ovociti ed embrioni, stadio e qualità degli embrioni trasferiti, e naturalmente tipo di procedura utilizzata per la vitrificazione dell'ovocita. In ultimo, per riuscire a ottenere dati conclusivi sullo stato di salute dei bambini nati grazie a tecnologie di riproduzione assistita è comunque essenziale continuare a seguirli nel tempo, tenendo conto del fatto che le alterazioni possono presentarsi progressivamente dalla nascita all'adolescenza e finanche alla maturità.

Stress ossidativo e infertilità

Numerose evidenze in letteratura sia *in vivo* che *in vitro* dimostrano nel modello animale o direttamente nell'uomo che il microambiente in cui si coltivano i gameti e

si sviluppano gli embrioni può influenzare sensibilmente la crescita e lo sviluppo dell'embrione stesso ed esercitare conseguenze anche nell'individuo adulto sotto forma di cambiamenti fenotipici epigenetici. Come detto in precedenza, molteplici sono i fattori che potrebbero avere impatto sulla salute gametica ed embrionale e poi riflettersi sulla salute del bambino nato e dell'individuo adulto in termini di maggiore predisposizione e incidenza di patologie cardiovascolari, metaboliche o addirittura tumorali. Tra questi fattori le specie reattive dell'ossigeno (ROS) svolgono un ruolo significativo, infatti, lo stress ossidativo è tra le principali cause di mal funzionamento dei gameti e di un compromesso sviluppo embrionale (Lampiao et al.,2012; du Plessis et al.,2008).

Lo stress ossidativo si manifesta quando i livelli di ROS, molecole con un numero spaiato di elettroni di valenza e per questo molto reattive, superano il sistema di difesa antiossidante nelle cellule. In condizioni fisiologiche, esiste un equilibrio tra la produzione di ROS e i sistemi antiossidanti.

Gameti ed embrioni sono fonti naturali di radicali liberi, ma durante i trattamenti e le diverse manipolazioni, necessarie per l'applicazione di una procedura di fecondazione *in vitro*, corrono il rischio di generare livelli sovra-fisiologici di ROS, inducendo uno stato di stress ossidativo che può avere un impatto significativo sull'IVF outcome (du Plessis et al.,2008). Durante le ART, gameti ed embrioni si trovano in un ambiente *in vitro* che ovviamente non è ottimale quanto quello *in vivo*, nel quale lo stress ossidativo e le ROS sono tenute sotto controllo dai sistemi antiossidanti endogeni (Agarwal et al., 2014). *In vitro*, quindi, lo sviluppo di stress ossidativo è maggiore che *in vivo* (Gupta et al.,2009) ed il suo impatto negativo è

amplificato sia dalla assenza dei sistemi antiossidanti sia dalla presenza di potenziali fonti multiple di ROS (Lampiao et al., 2012).

In vivo

Numerosissime sono *in vivo* le fonti di ROS; spermatozoi, ovociti ed embrioni ricavano energia dalla fosforilazione ossidativa, processo che è fisiologicamente accompagnato dalla formazione di specie reattive dell'ossigeno (du Plessis et al.,2008). Ogni eiaculato umano, ad esempio, contiene potenziali fonti di ROS, essendo costituito da diversi tipi di cellule, come spermatozoi maturi e immaturi, leucociti e cellule epiteliali. Durante la spermatogenesi possono accadere fenomeni per i quali si verifica un arresto che non permette la completa maturazione dello spermatozoo; ad esempio, potrebbe verificarsi un mancato riassorbimento del citoplasma, durante la spermio-istogenesi, che genera spermatozoi che presentano del citoplasma residuo in eccesso. Tale “goccia citoplasmatica” può attivare il sistema NADPH contribuendo alla produzione di ROS (Aitken et al.,1997). Ancora, i leucociti sono la fonte predominante di ROS nel seme umano, producono fino a 1000 volte più ROS rispetto agli spermatozoi (Whittington et al.,1999). Anche alcune patologie come il varicocele sono associate ad una grande quantità di ROS nel liquido seminale (Shiraishi et al.,2012). Gli uomini infertili affetti da varicocele hanno infatti un livello di stress ossidativo più alto e una minore concentrazione di antiossidanti (Agarwal et al.,2006). Per di più gli spermatozoi con morfologia alterata sono produttori di ROS. Le caratteristiche morfologiche della cellula spermatica sono il risultato di modificazioni cellulari molto complesse che si verificano durante la spermatogenesi e la spermio-istogenesi, e questo spesso rappresenta un parametro sottovalutato. La percentuale di spermatozoi teratomorfi,

così come anomalie strutturali specifiche, può servire da indicatore di un meccanismo difettivo nella produzione e maturazione degli spermatozoi (Said et al., 2005) e rappresentare un parametro predittivo per il successo di gravidanze spontanee o grazie a tecniche di riproduzione assistita (Shu et al., 2010). Gli uomini infertili con spermatozoi morfologicamente anomali hanno un'incidenza di aneuploidie due o tre volte superiore alla norma. Le anomalie morfologiche degli spermatozoi sono collegate non solo ad un aumento dei marker di danno genomico ma anche alla sovrapproduzione di ROS (Cocuzza et al., 2007).

Anche nella donna, come nell'uomo, livelli fisiologici di ROS svolgono un ruolo decisivo in diversi processi quali la steroidogenesi, la maturazione oocitaria, la follicologenesi e l'ovulazione (Agarwal et al., 2006; Esfandiari et al., 2005) ma la sovra-produzione ha effetti deleteri. La qualità oocitaria è collegata alla presenza di 8-idrossi-2'- Deossiguanosina (8-OHdG) (un biomarker di danno al DNA stress ossidativo indotto) nelle cellule della granulosa (Seino et al., 2002). Una scarsa qualità oocitaria potrebbe comportare uno sviluppo embrionale compromesso. Un eccessivo livello di ROS può distruggere il citoscheletro e alterare la funzione dei microtubuli generando aneuploidie (du Plessis 2008) e tali effetti potrebbero compromettere negativamente tanto l'esito di un concepimento naturale quanto l'outcome di una ART. Le cellule del cumulo interagiscono strettamente con l'ovocita e forniscono un supporto al suo stesso sviluppo, condividono il microambiente con esso e minimizzano i danni causati dalle ROS poiché sono in grado di produrre antiossidanti (Huang et al., 2010). Così come per le cellule della granulosa, anche per il cumulo ooforo l'aumento dei livelli di 8-OHdG è associato a ridotti tassi di fecondazione e scarsa qualità embrionale (Seino et al., 2002). Un'

ulteriore fonte di specie reattive dell'ossigeno è rappresentata dall'embrione stesso. L'embrione in rapido sviluppo produce energia attraverso la fosforilazione ossidativa e la glicolisi, entrambi i processi generano ROS. Tale produzione diventa particolarmente eccessiva durante l'attivazione del genoma embrionale, la compattazione e la schiusa poiché questi processi richiedono grandi quantità energetiche (Gott et al.,1990). Gli embrioni, però, esposti a livelli troppo elevati di ROS risultano di minore qualità e corrono il rischio di un blocco precoce dello sviluppo (Agarwal et al.,2003).

È chiaro, dunque che numerosi sono i fattori *in vivo* che possono influire sullo sviluppo embrionale e ripercuotersi poi avanti nel tempo. Tali cause possono essere non solo associate alle condizioni genetiche e patologiche dei genitori ma anche agli stili di vita degli stessi.

La dieta materna, ad esempio, ha un marcato impatto sia sul fenotipo pre-impianto, in embrioni di mammifero, che sullo sviluppo a lungo termine (Fig. 2). La malnutrizione materna può portare ad alterazioni a lungo termine nelle caratteristiche dei nati e, ancora, a variazioni della crescita postnatale, con conseguenti implicazioni sulla salute clinica del nato. Una regolare assunzione di sostanze nutritive è indispensabile per i processi di metilazione necessari per la stabilità genomica, la vitalità, l'espressione genica e l'imprinting nel nuovo nato (Guoyao et al., 2004).

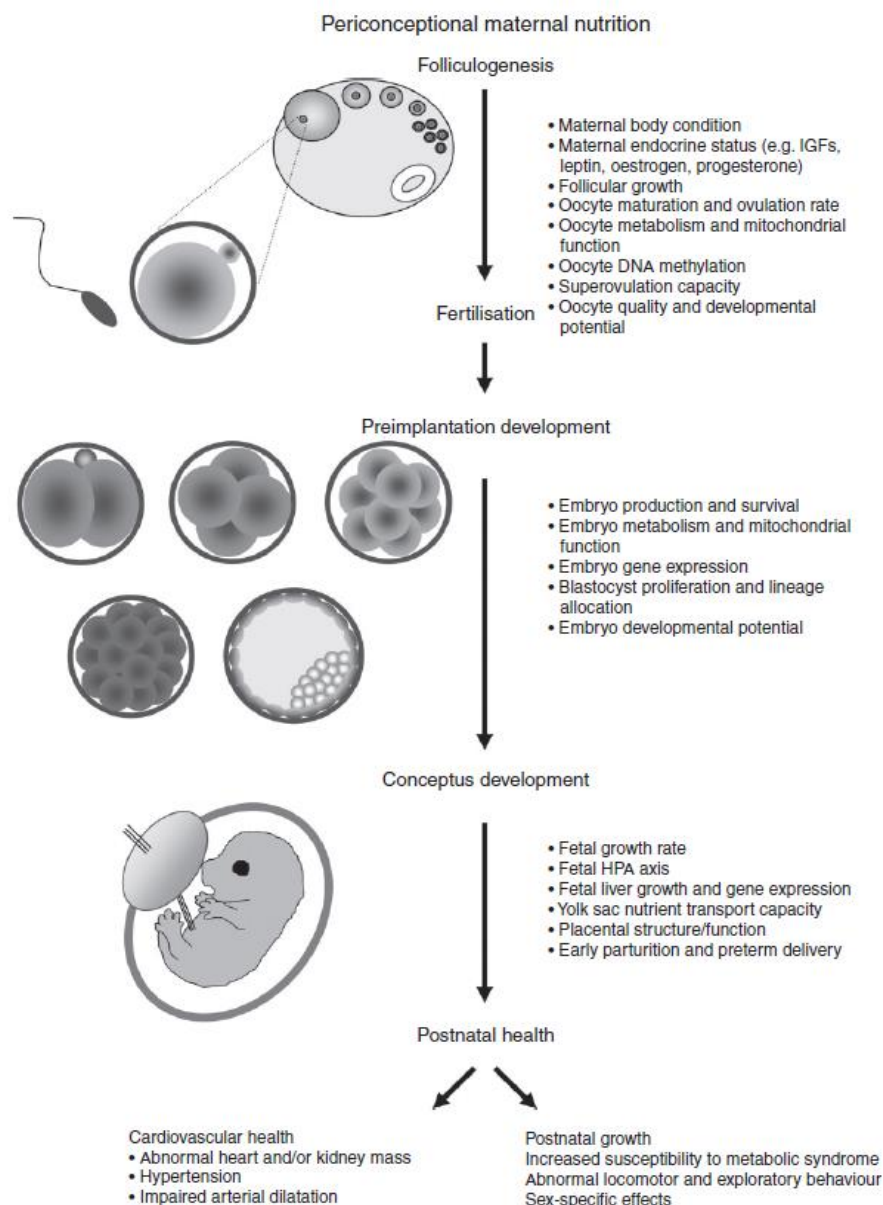


Figura 2: Effetti della dieta materna sullo sviluppo embrionale

Nel modello animale si è dimostrato che una dieta materna alterata nei nutrienti essenziali per soli 3-5 giorni, durante il periodo peri-concezionale o pre-impianto, o anche per tutta la gestazione influenza la salute del nato determinando l'insorgenza di disturbi metabolici e cardiovascolari nell'età adulta. Negli ovini, ad esempio, diete

ad alto contenuto proteico, nel periodo che precede il concepimento, sono associate ad una ridotta capacità di sviluppo e ad un peso maggiore alla nascita (McEvoy et al., 2001). Al contrario, una dieta a ridotto contenuto proteico, nei ratti, durante lo sviluppo pre- impianto, ha permesso l'osservazione di diversi cambiamenti fenotipici postnatali, anche se la prole poi veniva nutrita normalmente nel restante periodo gestazionale. Di questi effetti, il più evidente è il Low Birth Weight (LBW) cioè il basso peso alla nascita, ma si osservano anche alterazioni nella dimensione degli organi e insorgenza di ipertensione nell'individuo adulto (Kwong et al., 2000).

Il fenomeno LBW è abbastanza allarmante perché risulta strettamente associato a mortalità fetale e perinatale, ad una crescita inibita, ad un rallentato sviluppo cognitivo ed a malattie croniche che si presentano anche più tardi durante la vita dell'individuo (Stevens-Simon et al., 1999)

Studi epidemiologici hanno evidenziato che la suscettibilità degli individui adulti all'ipertensione e alle malattie cardiovascolari può derivare dal ritardo di crescita intrauterino e dal basso peso alla nascita indotto da malnutrizione materna. Ulteriori studi hanno dimostrato che la correlazione tra una dieta povera di proteine, low protein diet (LPD), nei ratti, e i problemi di ipertensione è da individuare nell'esposizione del feto, durante la metà o a fine gestazione, a elevati livelli di glucocorticoidi materni, successivi a LPD indotta, che provocano una riduzione dell'attività dell'enzima placentare di regolazione, 11β - idrossisteroide deidrogenasi di tipo 2 (Seckl et al., 1999). Una conseguenza a valle dell'aumento di glucocorticoidi è l'aumento dell'espressione dei componenti del sistema renina-angiotensina, e dell'enzima responsabile della conversione dell'angiotensina. Tale enzima catalizza la formazione dell'angiotensina II (potente vasocostrittore), la cui

mancata regolazione causa un elevato tenore di vasocostrizione, responsabile dell'ipertensione (Sherman et al., 1998). La dieta materna, ovviamente, risulta di grande impatto e interesse, soprattutto quando si parla dell'uomo. Carenze di micronutrienti essenziali inducono una serie di complicanze, quali ad esempio: complicanze visive nel caso di carenza di vitamina A, danni neurologici e dello sviluppo nel caso di carenza di vitamina B12 e, difetti del tubo neurale in assenza di folati (Jans et al., 2015). Alle donne in attesa è, quindi, consigliata l'assunzione di vitamina B12 e acido folico che sono, inoltre, indispensabili nel processo di replicazione e metilazione del DNA e, hanno effetti a lunga durata, contribuendo ad una ridotta incidenza di difetti del tubo neurale in fase di sviluppo. D'altro canto però, non sono da sottovalutare le disfunzioni causate dall'obesità materna. È stato dimostrato che la somministrazione dell'ormone proteico adiponectina, in femmine di topo gravide, previene gli effetti negativi dell'obesità sulla funzione placentare e sulla crescita fetale (Irving et al., 2015). L'obesità e le sindromi metaboliche sono i principali fattori di rischio per una vasta gamma di malattie, tra cui il diabete di tipo II, le malattie cardiovascolari e il cancro (Rhéaume et al., 2011; Wolin et al., 2010). La forte associazione tra obesità materna, durante la gravidanza, e l'insorgenza di sindromi metaboliche nell'infanzia è innescata, in parte, da un non ottimale ambiente intrauterino (Gluckman, Hanson 2004). L'obesità nelle donne in gravidanza è legata all'attivazione dell'insulina placentare e del complesso rapamicina1 (MTORC1) che up-regola specifici trasportatori di amminoacidi nella placenta, comportando una sovra crescita fetale (Jansson et al., 2013).

La sindrome metabolica è una delle patologie in forte incremento nel mondo e viene diagnosticata quando sono presenti almeno tre delle seguenti condizioni:

ipertensione, resistenza all'insulina, adiposità centrale, l'infiammazione sistemica, diminuzione lipoproteine e trigliceridi elevati (Fernandez-Twinn et al., 2010). Queste condizioni nel loro insieme aumentano sensibilmente il rischio di malattie cardiovascolari e di diabete di tipo II in un individuo (Jahan-Mihan et al., 2015). Oltre ad avere cause genetiche, lo sviluppo della sindrome metabolica è influenzato fortemente dall'ambiente e dalle abitudini dell'individuo stesso (fig. 3).

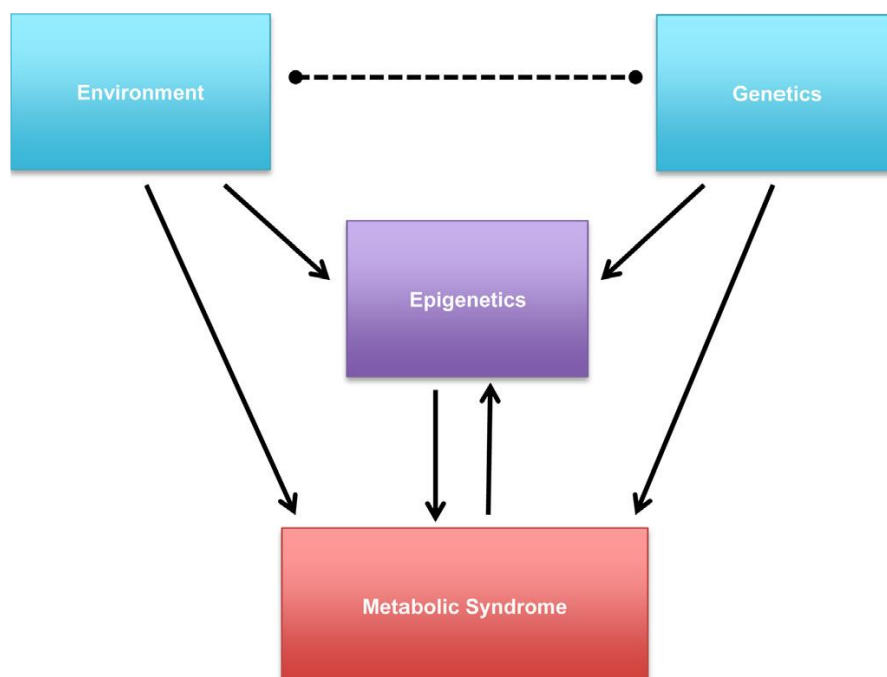


Figura 3: meccanismo di sviluppo della sindrome metabolica

La nutrizione è importante per i corretti processi genetici ed epigenetici durante lo sviluppo umano (Langley-Evans, 2015). I processi di sviluppo fetale e infantile si basano sulla presenza e sull'apporto di una corretta quantità e qualità delle sostanze nutritive. Variazioni o carenze delle sostanze nutritive durante i principali stadi di sviluppo possono influenzare lo sviluppo tessutale ed il fenotipo (Carolan-Olah et

al.,2015) e, addirittura, possono avere effetto sui fattori di rischio per le malattie non trasmissibili, compresa la sindrome metabolica. Come detto precedentemente, è noto che l'alimentazione materna prenatale ha un grande impatto sulla salute della prole durante lo sviluppo fetale in termini di ridotta crescita intrauterina, nascita pretermine, non adeguato peso alla nascita e difetti del tubo neurale. Queste disturbi si verificano in parte, anche, a causa della alterazione della metilazione del DNA, dunque a causa di cambiamenti epigenetici, dipendenti proprio dalla malnutrizione materna (Ashley et al.,2017). L'ambiente gestazionale svolge un ruolo fondamentale per la salute, non solo fisica, del feto. Molto recenti sono gli studi, sugli animali, che esaminano l'impatto dell'obesità materna sulle prestazioni cognitive e comportamentali della prole.

Differenze nella composizione, nel timing e nella durata di una dieta (ad esempio variazioni alimentari prima o dopo la gestazione) possono indurre una suscettibilità a sviluppare ansia, depressione, alterazioni della memoria e dell'attenzione nel nato. I dati attuali sostengono un'associazione negativa tra l'alto indice di massa corporea materno e il quoziente intellettivo del figlio e una chiara associazione tra l'obesità materna e l'ansia e la depressione nel nascituro. Anche in questi casi le ragioni sono da ricercare nei meccanismi epigenetici focalizzati prevalentemente sulla metilazione del DNA e sui pattern differenziali della metilazione stessa, coinvolti nei processi complessi che influenzano la programmazione dello sviluppo del cervello (Laura Contu et al.,2017).

Anche la nutrizione paterna ha la sua influenza; una review di questo stesso anno pone l'attenzione su questo aspetto che è stato ad oggi poco considerato. Una dieta sana, come la dieta mediterranea, ricca in sostanze nutritive come gli acidi grassi

omega-3, antiossidanti e vitamine, è associata ad una buona qualità del seme. In termini di gruppi alimentari, pesci, molluschi, frutti di mare, pollame, cereali, verdure, frutta, e latticini a basso contenuto di grassi sono stati positivamente correlati alla qualità del seme. Al contrario, diete ricche di carni lavorate, soia, patate, prodotti caseari, caffè, bevande alcoliche e zuccherate e dolci sono stati inversamente associati ad una buona qualità del seme (Albert Salas-Huetos et al.,2017). Inoltre è stato dimostrato che la prole derivante da padri obesi presenta una ipo-metilazione di IGF2, fattore di crescita fetale (Tobi et al.,2014). Tale ipo-metilazione risulta in un'over espressione del gene IGF2 che comporta obesità infantile. Dunque, anche per i padri, una buona nutrizione al tempo del concepimento è importante per ridurre al minimo il rischio di sviluppo di sindromi metaboliche nella prole.

In termine di stile di vita, del singolo o della coppia, l'abuso di nicotina, di stupefacenti o di alcool, come è facile intuire, può avere effetti teratogeni.

Le abitudini di un soggetto, dunque hanno un grande impatto sulla qualità dei gameti e si riflettono di conseguenza sulla salute dei nati; il tabagismo nell'uomo, ad esempio, è associato ad una scarsa qualità del seme perché le sostanze presenti nelle sigarette come la nicotina, il cadmio e gli alcaloidi favoriscono, non solo la produzione di radicali liberi, ma è stato provato che impedirebbero l'azione di un enzima che inizia il riparo del DNA (OGG1) nello spermatozoo. All'incompleto riparo del danno al DNA paterno consegue una maggiore incidenza d'interruzioni spontanee della gravidanza e di predisposizione al cancro infantile nei nati (Aitken et al., 2014). Il fumo, i metalli pesanti, le onde elettromagnetiche dei telefoni cellulari, l'ipertermia testicolare, causata ad esempio da tessuti come jeans o lycra, il bisfenolo

A, che ritroviamo in molte plastiche e in oggetti di uso comune, rappresentano tutti fattori associati ad un forte incremento delle specie reattive dell'ossigeno accompagnato spesso da una riduzione delle difese antiossidanti (Wright et al.,2014).

E' ben noto che gli uomini non smettono di produrre spermatozoi con l'invecchiamento. Tuttavia, la qualità dei loro gameti mostra un declino età dipendente, come dimostrato da un aumento significativo del danno al DNA (Schmid et al., 2007). Con l'avanzare dell'età, quindi, si osserva un aumento dello stress ossidativo a livello spermatico il quale comporta una down regolazione dei geni associati al Base Excision Repair Pathway (BER) ovvero una down regolazione dei geni coinvolti nei meccanismi di riparo del DNA (Paul et al.,2011).

Da un esame attento del liquido seminale in soggetti al di sopra dei 40 anni sembra esserci un'alterazione di parametri quali: la diminuzione di volume del liquido seminale, causata dal declino del testosterone, un cambiamento della concentrazione totale degli spermatozoi, una riduzione della motilità spermatica ed un aumento del tasso di frammentazione del DNA; ma il dato che denota più attenzione è l'aumento di mutazioni e di alterazioni geniche collegate all'età paterna. È noto che ad ogni divisione cellulare aumenta la percentuale di errori nel genoma, ed il rischio di trasmissibilità di mutazioni geniche diventa sempre più alto. Queste osservazioni mettono in luce l'importanza dell'età paterna e la sua influenza sull'aumento del rischio di malattie come la schizofrenia e l'autismo nei figli (Kong et al., 2012). Insomma, con l'avanzare dell'età paterna si riscontra una l'alterazione di numerosi parametri, che riguardano non solo le caratteristiche rilevabili da una analisi del liquido seminale, ma anche lo stato di salute dei gameti e può comportare seri rischi

di aborto così come l'insorgenza di patologie come autismo e schizofrenia (Janecka et al., 2017)

È evidente, quindi, che a prescindere dalle tecniche di riproduzione assistita, l'embrione può essere soggetto ad una serie di insulti che si riflettono sul suo sviluppo e sulla sua salute anche durante il concepimento *in vivo*.

In vitro

In vivo, ovvero durante un concepimento naturale, numerosi fattori influenzano lo sviluppo embrionale e possono inficiare la salute del nato e del futuro uomo adulto. Non vi è da stupirsi, quindi, che negli ultimi anni, il successo delle procedure di fecondazione *in vitro* abbia attirato molta attenzione, soprattutto riguardo al fatto che la variabilità dei fattori associati alle tecnologie di riproduzione assistita possa avere conseguenze sia sull'embrione che sul nato, in termini di danni iatrogeni ai gameti in primis ed agli embrioni e ai nati poi.

Come già accennato, *in vitro*, il rischio di sviluppare stress ossidativo è maggiore rispetto che *in vivo* (Gupta et al., 2009). Il suo impatto negativo può essere amplificato a causa della mancanza di meccanismi fisiologici di difesa, dell'assenza di risorse naturali antiossidanti e della presenza di più fonti potenziali di ROS (Lampiao et al, 2012). Tali fonti di ROS possono essere sia endogene, e provenire dai gameti e dagli embrioni stessi, che esogene e derivare da fattori ambientali. Lo stress ossidativo che ne deriva si tradurrà in conseguenze sui tassi di fecondazione, sull'esito della gravidanza e sulla salute dei nati, sia a breve che a lungo termine.

In termini di stress ossidativo, il fattore chimico che maggiormente desta attenzione, quando si parla di colture cellulari ed embrionali *in vitro*, è ovviamente l'ossigeno.

All'interno dell'ovidotto e dell'utero dei mammiferi la concentrazione di ossigeno è circa del 2-8% (Bishop,1957; Mastroianni e Jones,1965; Fisher e Bavister, 1993), mentre l'ossigeno presente nell'aria è circa il 20%. Già quarant'anni fa Whitten pubblicò uno studio nel quale dimostrava gli effetti benefici dell'ossigeno fisiologico (circa il 5%) sulla cultura embrionale pre-impianto. Egli notò, infatti, che embrioni di topo coltivati al 5% di ossigeno arrestavano il loro sviluppo se coltivati poi al 20% (Witten,1969). Constatò, inoltre, che la richiesta di ossigeno è ben specifica e che sia l'eccesso che la scarsità possono danneggiare la superficie della membrana inficiando, così, lo sviluppo. Conseguentemente a tali studi, si iniziò ad adottare una ridotta tensione di ossigeno nel mix di gas utilizzato per le colture embrionali, nello specifico: 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂ (Witten,1971). Altri autori, negli anni successivi, confermarono le osservazioni di Witten anche in altre specie animali, concordando tutti che la coltura ad una ridotta concentrazione di ossigeno supporta in maniera ottimale lo sviluppo embrionale (Tervit et al.,1972; Quinn e Harlow 1978; Karagenc et al.,2004; Batt et al.,1991; Berthelot e Terqui, 1996). Altra evidenza emersa in numerosi lavori è che il preimpianto dell'embrione presenta una sensibilità stadio-specifica allo stress, ed in particolare all'ossigeno. L'esposizione di ovociti pronucleati all'ossigeno atmosferico per un'ora, induce una riduzione dello sviluppo allo stadio di morula e blastocisti anche se per il restante tempo di coltura la concentrazione di ossigeno è quella ottimale (Pabon et al.,1989; Umaoka et al.,1992). Anche Karagenc et al. Concordano su tale aspetto, riportando che l'esposizione di ovociti pronucleati, per tempi prolungati, all'ossigeno atmosferico risulta in un significativo decremento del numero di cellule della blastocisti (Karagenc et al., 2004). Il danno indotto dal 20% di ossigeno è un danno irreversibile, difatti anche il

cambiamento dal 20% al 5% di ossigeno, durante la coltura, non mitiga le perturbazioni provocate durante lo stadio iniziale dello sviluppo preimpianto. Ciò, non solo dimostra l'irreversibilità del danno ma conferma la sensibilità stadio specifica dell'embrione. Gli effetti deleteri dell'elevata concentrazione di ossigeno sull'embrione nei primi stadi di sviluppo non sono solo irreversibili ma anche cumulativi (Kirkegaard et al.,2013). Ciò può essere spiegato dal fatto che l'ossigeno regola tutti i processi cellulari durante il periodo di preimpianto partecipando anche alla regolazione dell'espressione genica (Gardner e Lane, 2005; Rinauldo et al., 2006). Da studi su modelli animali, embrioni coltivati al 5% di ossigeno mostrano poche differenze nel pattern globale di espressione genica se paragonati ad embrioni *in vivo*, ed inoltre, embrioni coltivati al 20% esibiscono un incremento significativo della metilazione genomica, indicando che lo stress ossidativo influenza l'epigenetica embrionale (Li et al.,2014).

L'ossigeno mostra il suo impatto anche nella senescenza cellulare, si sono ritrovate differenze di espressione nei markers di arresto del ciclo cellulare negli embrioni coltivati al 5% di ossigeno, al 20% o *in vivo*. In generale, sia la coltura al 5% che quella al 20% inducono una maggiore espressione dei marker di senescenza e danno ossidativo (rispettivamente senescence-associated β -galactosidase e istone γ H2AX), confrontati con la coltura *in vivo*, ma, in particolar modo, blastocisti coltivate al 20% presentano alti livelli di entrambi i markers rispetto a blastocisti coltivate al 5%. Ciò può essere spiegato dal fatto che l'energia utilizzata dall'embrione per cercare di riparare il danno al DNA porta le cellule all'arresto inficiando quindi la vitalità dell'embrione stesso (Meuter et al.,2014).

Un'osservazione molto interessante riguardo ai danni indotti dall'ossigeno è che le femmine sono più sensibili a tali ripercussioni rispetto ai maschi. Gli embrioni dei due sessi differiscono nell'espressione genica, nella proteomica e nel metabolismo, viene da sé, quindi, che anche la risposta a danni indotti è diversa (Gardner et al., 2011). Dati molto recenti mostrano che, nell'uomo, l'embrione maschio sviluppa più velocemente rispetto alla femmina in condizioni non fisiologiche (Bronet et al., 2015). In definitiva, quindi, la coltura embrionale a basse concentrazioni di ossigeno migliora i tassi di successo di una tecnica di fecondazione assistita incrementando i tassi di nascite (Bontekoe et al., 2012)

All'interno del tratto riproduttivo femminile i processi di fecondazione e di sviluppo embrionale richiedono, non solo una bassa concentrazione di ossigeno, ma anche la totale assenza di luce. La manipolazione *in vitro* di gameti ed embrioni, invece, comporta l'inevitabile esposizione di questi alla luce, a diverse lunghezze d'onda, proveniente sia dal microscopio che dall'illuminazione dell'ambiente circostante. Nel modello animale è stato mostrato che la luce può alterare lo sviluppo embrionale direttamente o indirettamente attraverso la foto-ossidazione dei componenti dei mezzi di coltura (Li R et al., 2014). La luce che ricade nello spettro del visibile ha effetti dannosi sui gameti e sullo sviluppo dell'embrione, il suo impatto negativo è influenzato dalla durata dell'esposizione, dall'intensità e dalla composizione spettrale della luce stessa (Ottosen et al., 2007). La luce blu (400-500 nm), ad esempio, è particolarmente dannosa perché potrebbe generare perossido di idrogeno e alterare gli enzimi della catena respiratoria (Squirrell et al., 1999). In un lavoro del 2007 si è mostrato che embrioni di topo esposti a luce blu presentavano ridotti tassi di formazione di blastocisti, più alti tassi di apoptosi blastomeriche e un'aumentata

produzione di ROS nella morula (Oh SJ et al.2007). Numerosi altri studi hanno documentato l'effetto avverso dell'esposizione alla luce visibile nel modello animale (Squirrell et al.1999; Takahashi et al.2007). L'irradiazione luminosa nei mezzi di capacitazione degli spermatozoi umani, incrementa la iper-motilità (Shahar et al.,2011), una alterazione della cinetica spermatica che migliora la forza di penetrazione dello spermatozoo in fluidi viscosi quali la matrice del cumulo ooforo e la zona pellucida (Jin et al.,2007). C'è da dire però, che la produzione di ROS in questi spermatozoi risulta aumentata già dopo 1-3 minuti di esposizione alla luce, rischiando così di generare uno stato di stress ossidativo con tutte le conseguenze precedentemente esposte (Shahar et al.,2011). Lo stato di pre-compattazione dell'embrione è lo stato più sensibile ai danni della luce, l'avvento dei sistemi di time-lapse ha permesso l'impiego di luci a lunghezze d'onda elevate e quindi ad energia minore, combinati con tempi di esposizione moderati, permettendo perciò una riduzione dello stress a livello embrionale (Chen et al.,2013).

Un ulteriore fattore che ha grande influenza durante le procedure di fecondazione assistita è rappresentato dai mezzi in cui vengono coltivati gameti ed embrioni. È indiscutibile il ruolo che essi ricoprono durante una coltura embrionale, sono, infatti, deputati a garantire un ambiente adeguato a sostenere lo sviluppo. Gli amminoacidi sono tra i componenti essenziali dei mezzi di coltura, sono indispensabili in ogni stadio di sviluppo e rappresentano una fonte necessaria per mantenere l'omeostasi (Gardner et al., 2013). Tuttavia, l'incubazione a 37° dei mezzi induce la scissione spontanea degli amminoacidi provocando il rilascio di ammonio in maniera tempo dipendente nel mezzo di coltura. Nel topo è stato dimostrato che l'accumulo di ammonio ha un impatto negativo sulla fisiologia dell'embrione, sul suo sviluppo e

sulla sua stessa vitalità. Biggers et al., nel 2000 dimostrarono che un eccesso di ammonio riduceva i tassi di blastocisti e si traduceva in difetti del tubo neurale nel modello murino. Anche nell'uomo è stato dimostrato quanto questo ione possa influenzare la fisiologia embrionale esercitando un effetto negativo sulla formazione della blastocisti (Virant-Klun et al., 2006) ed alterando inoltre l'attività metabolica e l'espressione genica (Gardner et al., 2013).

L'eccesso di ammonio, ed in generale la composizione dei mezzi, potrebbe influire sull'espressione genica alterando il pattern di metilazione già nell'embrione a due cellule. Tutto ciò potrebbe costituire una delle spiegazioni dell'incremento di rischio di disordini di imprinting nei neonati IVF (Lane and Gardner 2007; Kleijkers et al., 2015). Come già detto per l'ossigeno e per la luce, la fase di pre-compattazione appare la più sensibile allo stress ed anche all'ammonio. Perfino una breve esposizione, durante tale stadio, può influire pesantemente sullo sviluppo e sull'espressione genica negli stadi tardivi (Zander et al., 2006). Post-compattazione, l'embrione ha una maggiore capacità di mantenere il pH a livelli fisiologici (Edwards et al., 1998) a differenza della fase pre-compattazione, e l'ammonio partecipa nel ridurre tale abilità, per questo risulta associato con la diminuzione della vitalità e delle competenze di sviluppo (Lane and Gardner, 2003; Zander et al., 2006) (Fig.4).

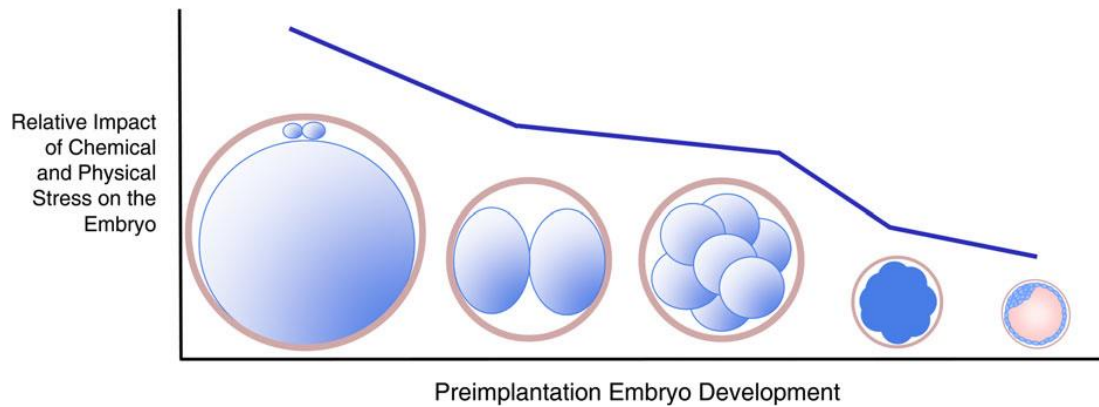


Figura 4: Effetto di fattori chimici e fisici sulla fase pre-impianto

Recentemente, una grande risonanza, è stata acquisita dal possibile effetto dei mezzi di coltura sul peso alla nascita dei bambini nati da fecondazione assistita. Un lavoro del 2015 mostra che esiste un collegamento tra il tempo di stoccaggio di un mezzo e il peso alla nascita del bambino, più a lungo un mezzo viene conservato, maggiore è la probabilità che si verifichi alla nascita il LBW (Kleijkers et al., 2015). Altri lavori hanno dimostrato, invece, che l'uso di diversi mezzi di coltura e dunque, le diverse composizioni chimiche dei mezzi, determinano differenze nel peso alla nascita (Dumoulin et al., 2010; Nelissen et al., 2012; Eskild Et al., 2013; Hassani et al., 2013; Zhu et al., 2014). Tali differenze potrebbero, però, manifestarsi sotto forma di effetti a lungo termine e persistere fino ai due anni dopo la nascita (Kleijkers et al., 2014). In letteratura, come spesso accade, i dati sono discordanti, infatti, una review del 2015 riporta una attenta analisi di 11 articoli trattanti l'influenza dei mezzi di coltura sul peso alla nascita, di questi, 5 mostrano significative differenze nel peso in base ai diversi mezzi considerati mentre i restanti 6 non supportano tale tesi (Zandstra et al., 2015). Una causa che possa spiegare l'influenza dei mezzi di coltura sul peso alla nascita potrebbe essere rappresentata dalle proteine che compongono il

mezzo stesso. È noto infatti che un diverso apporto proteico ha effetti sullo sviluppo (Zhu et al.,2014). Ancora, una spiegazione degli effetti indotti dalla coltura potrebbe essere legata a disturbi epigenetici, come la metilazione già citata, causati da diversi componenti dei mezzi. Tali disturbi potrebbero influenzare la programmazione dello sviluppo del feto e dei tessuti placentari (Khosla et al.,2001; Young et al., 2001; Mann et al.,2004; Fauque et al.,2010). Le risposte alla domanda se esista o meno una vera relazione tra le condizioni di coltura e l'outcome perinatale sono estremamente rilevanti, perché potrebbero essere utili per spiegare e ridurre rischi quali il basso peso alla nascita. La corretta formulazione dei mezzi potrebbe essere una delle soluzioni ma c'è la necessità di ulteriori studi randomizzati.

Minimizzare lo stress ambientale aiuta a mantenere l'omeostasi cellulare e costituisce una componente cruciale per ottimizzare lo sviluppo embrionale *in vitro*. Altro elemento di particolare interesse è il pH, poiché l'omeostasi intracellulare è altamente sensibile alle variazioni di tale fattore. Fluttuazioni della concentrazione di ioni idrogeno (pH) nei terreni di coltura possono avere effetti deleteri sulla motilità spermatica, sulla maturazione oocitaria e sullo sviluppo embrionale (Swain et al.,2012). Anche un'esposizione transitoria a mezzi acidificati, che hanno quindi subito variazioni di pH, può avere effetti sia sul peso che sulla lunghezza fetale (Zander-Fox Et al., 2010). Pertanto, anche se l'embrione umano possiede diversi meccanismi intracellulari per regolare il suo pH interno (Phillips et al., 2000) occorre prestare attenzione per minimizzarne le oscillazioni.

Nelle colture *in vitro* si impiegano sistemi tampone bicarbonato/anidride carbonica. Il giusto equilibrio tra bicarbonato e anidride carbonica permette di avere il pH richiesto. Mantenere il pH stabile (pH=7.4) è possibile grazie al mantenimento dei

livelli di CO₂ negli incubatori costanti e all'uso di sistemi tampone nei mezzi di coltura.

Buffer biologici, come HEPES e MOPS, sono preziosi strumenti per stabilizzare il pH mantenendolo costante durante le manipolazioni al di fuori dell'incubatore (Will et al.,2011). Numerosi studi indicano che l'HEPES è in grado di sostenere la maturazione ovocitaria, la fecondazione e lo sviluppo degli embrioni in un ambiente diverso dall'incubatore; altri riportano, invece, che esposizioni a lungo termine a HEPES (o a MOPS) provocano degenerazione degli ovociti, tassi di fecondazione inferiori e una compromessa formazione della blastocisti (Will et al.,2011). L'insieme di tali fattori esogeni può interferire con i processi intracellulari, causando danni alle cellule, ed innescare reazioni a catena che inducono o aumentano la produzione di ROS.

In termini di danni iatrogeni, oltre a fattori fisici e chimici, hanno un grande peso anche fattori meccanici come la centrifugazione. La centrifugazione è una tecnica di routine durante la preparazione del liquido seminale per rimuovere il plasma seminale che come già detto rappresenta una potenziale fonte di ROS (Shekarriz M. et al., 1995); purtroppo, la centrifugazione stessa contribuisce ad incrementare il livello di ROS, di fatti, è stato visto che nonostante gli spermatozoi abbiano una buona qualità di partenza, l'esposizione a tempi prolungati di centrifugazione causa un forte calo dei parametri spermatici (Henkel RR et al.,2003). La correlazione tra centrifugazione e stress ossidativo è stata confermata dal fatto che l'aggiunta di antiossidanti durante tale procedura riduce la produzione di ROS e il danno spermatico (Lampiao F et al., 2010). Guimarães et al., nel 2014 dimostrano, inoltre, che la produzione di ROS è proporzionale alla forza in accelerazione di gravità (g)

impiegata durante la centrifugazione, maggiore è la velocità di centrifugazione maggiore sarà la quantità di ROS e di conseguenza l'impatto sulla salute dello spermatozoo. Questo lavoro ha dimostrato per la prima volta che la centrifugazione ad una ridotta velocità ($2200 \times g$) migliora la penetrazione e il tasso di fecondazione degli spermatozoi senza ridurre il recupero rispetto alla forza di centrifugazione tipica ($9000 \times g$) attualmente utilizzata durante una IVF.

Una delle pietre miliari nell'ambito della biologia della riproduzione umana è stata la criopreservazione di gameti ed embrioni. Questo processo permette di congelare e conservare in azoto liquido cellule, come i gameti, frammenti di tessuto ed embrioni alla temperatura di $-196^{\circ} C$ a tempo indeterminato (Pegg DE, 2007). Nonostante alcune riserve sulla crioconservazione quali problemi etici (embrioni abbandonati) e danni indotti alle strutture da congelamento e scongelamento, le tecnologie di crioconservazione riproduttiva rappresentano importanti strategie per la conservazione della fertilità, soprattutto in pazienti oncologici, ed inoltre limitano l'incidenza di gravidanze multiple e migliorano la resa dei cicli di ART riducendo anche i rischi di iper-stimolazione ovarica.

I primi ad intraprendere con successo la strada della criopreservazione nell'ambito della fertilità furono Bunge e Sherman nel 1953 con il seme umano e con gli embrioni e molto dopo, anche se con meno successo, Chen nel 1986 con gli ovociti. Esistono due tipologie di congelamento: congelamento lento (slow cooling) e vitrificazione. Sino al 2009 la tecnica predominante utilizzata per la crioconservazione era quella del congelamento lento, tecnica in cui i campioni sono esposti a concentrazioni crescenti di crioprotettori e raffreddati lentamente fino a $-196^{\circ}C$. Negli ultimi anni, è stata, invece, introdotta la vitrificazione, che impiega

concentrazioni molto più elevate di crioprotettori e tempi di raffreddamento molto più rapidi.

L'uso di crioprotettori limita i danni alle strutture cellulari indotti dalla crioconservazione stessa. Tali danni possono essere dovuti ad “effetti di cristallizzazione” cioè alla formazione di cristalli intra ed extra cellulari che danneggiano membrane ed organelli, o ad “effetti soluto” dovuti, cioè, alla solidificazione dell'acqua che crea una variazione di concentrazione di soluti determinando variazione di pH, di volume e alterazioni molecolari, in ultimo, questi danni possono essere dovuti ad “effetti di ricristallizzazione” cioè durante lo scongelamento si formano altri cristalli intracellulari nei cristalli più grandi già presenti. Lo scongelamento rappresenta un momento estremamente critico poiché operazioni non eseguite adeguatamente possono indurre ulteriori danni alle cellule. Durante questa fase si ha un riscaldamento rapido ed una graduale reidratazione mediante esposizione a concentrazioni decrescenti di crioprotettori.

Molti studi sono stati dedicati ai danni da congelamento, come già accennato, l'effetto soluto e la formazione di ghiaccio intracellulare sono stati identificati come i principali elementi responsabili dei danni da congelamento (Lovelock, 1953, Mazur, 1963; Farrant, 1977; Belous e Bondarenko, 1982). Questi fondamentali problemi vengono si limitati mediante l'uso di crioprotettori, ma questi in eccessive concentrazioni risultano tossici, per cui rappresentano essi stessi un potenziale danno durante una metodica di congelamento. Mazur nel 1963 ha mostrato che la velocità di raffreddamento influenza la possibilità di cristallizzazione intracellulare. Un raffreddamento rapido, infatti, minimizza la formazione di cristalli di ghiaccio, per questo la vitrificazione risulta una metodica più adeguata rispetto al congelamento

lento (Mazur et al., 1963). Al momento dello scongelamento vi è un'inversione del processo di raffreddamento e gli obiettivi di base sono reidrattare la cellula e rimuovere gradualmente il crioprotettore che ha permeato la cellula stessa per evitare lo shock osmotico (Leibo et al., 1974). Nel corso degli anni, dunque, si sono evolute diverse strategie di congelamento/scongelamento che hanno migliorato la resa e il successo del processo stesso. Si è passati dal congelamento lento alla vitrificazione fino ad arrivare al congelamento in azoto solido (slush nitrogen), nonostante ciò, bisogna dire che è, in ogni caso, una procedura estremamente stressante capace di modificare la struttura e l'integrità delle cellule, andando ad inficiare il metabolismo e perturbando l'integrità genomica (Di Santo et al., 2012; Albertini e Olsen, 2013). Per quanto riguarda gli spermatozoi, diversi lavori dimostrano che durante la criopreservazione, ovvero, durante l'intero procedimento di congelamento e scongelamento, nonostante l'utilizzo di crioprotettori, si verifica un incremento del danno ossidativo al DNA, dei livelli di frammentazione genomica e delle alterazioni della struttura acrosomica, ed inoltre tali cellule, al momento dello scongelamento, presentano una ridotta motilità ed una diminuzione della vitalità (Thomson LK et al., 2009; Zribi N et al., 2010). Negli spermatozoi si ha quindi una riduzione del potere fecondante in seguito al congelamento che, chiaramente, può compromettere il successo di una IVF.

La supplementazione con antiossidanti dei mezzi di congelamento protegge gli spermatozoi dagli effetti del processo di congelamento/scongelamento (Zini A et al., 2011). È stato visto, ad esempio, che la supplementazione del mezzo di congelamento con quercetina (Zribi N et al., 2012) e catalasi (Moubasher AE et al., 2013) protegge gli spermatozoi dai danni ossidativi e migliora la motilità, la

vitalità e l'integrità genomica degli stessi. Risultati simili si sono ottenuti con l'aggiunta di vitamina E (Taylor K et al.,2009) e pentoxifillina, nello specifico, tali antiossidanti aggiunti al mezzo di crioconservazione determinano il miglioramento della motilità post-scongelo.

Sono numerosi gli studi sulla crioconservazione degli ovociti, processo piuttosto inefficiente. Le cellule uovo essendo più grandi, ricche di acqua e di lipidi e difficilmente disidratabili, rispetto agli spermatozoi, risentono maggiormente dei danni da congelamento soprattutto in termini di persistenza di alterazioni geniche, danni ultrastrutturali dovuti alla formazione di cristalli di ghiaccio, stress osmotico e tossicità data dai crioprotettori; tutto ciò comporta che al momento dello scongelamento, l'ovocita potrebbe non essere più adatto alla fecondazione (M.A. Khalili et al.,2012). È stato mostrato, inoltre, che il congelamento lento è associato all'esocitosi dei granuli corticali, al rigonfiamento del reticolo endoplasmatico liscio e a danni mitocondriali; tali lesioni potrebbero essere responsabili della ridotta capacità di sviluppo degli ovociti crioconservati (Gualtieri et al.,2009). La letteratura attuale concorda nell'affermare che il congelamento degli embrioni, piuttosto che dei gameti, costituisce la soluzione più favorevole in termini di successi di gravidanza e di salute del nato; difatti le gravidanze ottenute dopo trasferimento di un embrione congelato sono associate ad un minor rischio di mortalità perinatale, di nascite pretermine e di LBW (Piotr M et al., 2016). Il vantaggio offerto dal congelamento degli embrioni è che essi sono molto più stabili dal punto di vista di membrane rispetto all'ovocita e questo dà la possibilità, alla paziente, di ritentare una gravidanza senza sottoporsi a nuove stimolazioni ormonali.

Nonostante questo, però, la criopreservazione ovocitaria è preferita a quella embrionale che solleva controversie etiche e legali in molti paesi. In Italia, per esempio, fino al 2009 la legge 40/2004 consentiva la fecondazione di massimo tre ovociti per ogni ciclo e fissava l'obbligo di impiantarli tutti contestualmente proibendo quindi la crioconservazione. La sentenza n° 151 della Corte Costituzionale ha demolito parte della legge 40, eliminando in particolare il limite dei tre embrioni e il divieto di crioconservazione risolvendo, così, diversi problemi che rendevano la riproduzione assistita quasi incompatibile rispetto alla buona pratica medica. La coppia, insieme al medico, può decidere ora liberamente, senza compromettere la salute della donna e nell'interesse della salute del nascituro, di trasferire il numero di embrioni più adatto al caso clinico ed eventualmente di congelare gli embrioni soprannumerari per un successivo trasferimento embrionale, evitando gravidanze plurime pericoloso per le donne e per i figli. La crioconservazione degli embrioni solleva rilevanti problemi etici, primo fra questi il problema degli "embrioni abbandonati" poiché danneggiati dalle tecniche stesse o perché la paziente, stessa, rinuncia ad una nuova gravidanza. Questo pone l'accento sul problema dello statuto ontologico dell'embrione ovvero su quando un embrione viene considerato essere umano con una propria identità e quindi, queste manipolazioni rispettano la dignità degli embrioni stessi?

In Italia, attualmente, non esiste una norma che regoli il destino degli embrioni abbandonati, vengono ancora valutate diverse opzioni come usarli per sperimentazione o darli in adozione, ma la regola attuale è quella di conservarli fino a morte accertata.

Inoltre, per ora, la L.40/2004 vieta la soppressione degli embrioni e qualsiasi sperimentazione consentendo “la ricerca clinica e sperimentale a condizione che si perseguano finalità esclusivamente terapeutiche e diagnostiche ad essa collegate volte alla tutela della salute e allo sviluppo dell’embrione stesso” (art.13).

L’obiettivo odierno, in virtù anche di quanto detto sin ora, è quello di migliorare le metodologie di congelamento al fine di migliorare la qualità gametica post scongelamento, i tassi di fecondazione e ridurre le conseguenze natali e perinatali.

L’uso di antiossidanti può essere un supporto per implementare la qualità dei gameti post scongelamento, ma ciò che ha permesso di ottenere risultati incoraggianti è l’avvento di nuove tecniche di crioconservazione come la vitrificazione. Con tale metodica, che è attualmente quella maggiormente in uso, si sono ottenuti, ad esempio, ovociti vitali paragonabili ad ovociti freschi e simili tassi di impianto, di gravidanza clinica e di sopravvivenza embrionale (Sole M et al.,2013).

È consequenziale che avendo un grande effetto a livello cellulare e, in particolare, a livello genomico, i processi di congelamento/scongelamento influenzano anche, e soprattutto, l’outcome di gravidanza.

La criopreservazione, come detto precedentemente, rappresenta una valida opportunità per i pazienti oncologici di poter consolidare il loro desiderio procreativo. I pazienti oncologici in età prepubere, in cui la produzione di gameti maturi non è ancora iniziata hanno come unica alternativa, la criopreservazione del tessuto gonadico. Negli ultimi anni, nella comunità scientifica questa metodica sta assumendo sempre più rilevanza ed alla vitrificazione si uniscono ora nuovi sistemi di congelamento, quali ad esempio lo slush nitrogen, che migliorano il recupero di

tessuto ovarico o di gameti in buone condizioni (Talevi et al.2016; Sansinema M et al., 2012).

Il miglioramento continuo delle tecniche di crioconservazione che sia cellulare o gametica, dunque, rappresenta una garanzia per il successo delle ART.

Si è finora discusso su tutti i fattori e le diverse manipolazioni, gametiche o embrionali, implicate nel processo di riproduzione assistita. Ma non solo l'ambiente in cui una specifica tecnica ART ha luogo può influenzare lo sviluppo e la salute, ma la tecnica stessa può esercitare il suo peso. L' ICSI (iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo), nello specifico, ha sempre destato grandi timori, soprattutto da parte dei medici che considerano con sospetto tutto ciò che ha forti contenuti manipolativi. I rischi dipendenti dall'utilizzo della ICSI includono la possibilità di lesionare l'ovoplasma o il fuso meiotico durante la pratica e selezionare uno spermatozoo anomalo. Ancora, non è escluso che durante la procedura si possa iniettare anche una piccola quantità di mezzo di coltura e di suoi componenti dannosi. Questo riduce la possibilità di formazione della blastocisti, si genera il fenomeno biologico del "tutto o niente" cioè gli embrioni sopravvivono alla micromanipolazione senza particolari anomalie o muoiono, ciò è estremamente dipendente, però, dall'abilità del tecnico che svolge la procedura più che dalla tecnica in sé (Dumoulin JM et al., 2001). Vi sono dei rischi che non sono dipendenti dalla tecnica, ma che allo stesso modo si riflettono sullo sviluppo e sulla salute dell'embrione. Una ragione di sofferenza embrionale e fetale potrebbe essere anche ricercata nelle caratteristiche genetiche e cliniche delle coppie sterili. Alcune donne e molti uomini che ricorrono alla procreazione medicalmente assistita hanno problemi genetici, che potrebbero essere ereditati dai figli.

I rischi che si incorrono durante una ICSI sono rappresentati, ad esempio, dalla possibilità di fecondare un ovocita con uno spermatozoo portatore di anomalie genetiche o di difetti strutturali; esiste, anche, la possibilità di fecondare ovociti anomali che la selezione naturale avrebbe escluso. Questi eventi possono essere causa di aborto o di nascita di feti malformati e possono evidenziarsi in momenti molto diversi dello sviluppo embrionale. Gli uomini infertili con spermatozoi morfologicamente anomali hanno un'incidenza di aneuploidie da due a tre volte superiore alla norma; tutto ciò, naturalmente, rappresenta la causa di un aumento del rischio di anomalie genetiche nel prodotto del concepimento. Inoltre gli uomini subfertili soffrono frequentemente di anomalie genetiche e microdelezioni del braccio lungo del cromosoma Y, che non riducono la probabilità di concepire qualora si applichino le tecniche di microiniezione, ma che vengono facilmente incorporate nel genoma dei figli di sesso maschile (Hopps CV et al.,2003). Dunque “i bambini ICSI” presentano un aumentato rischio di anomalie cromosomiche che si correla con il rischio genetico dei genitori e non propriamente con la tecnica di fecondazione utilizzata.

La conseguenza più allarmante che è stata registrata nei bambini ICSI è il loro ridotto peso alla nascita, molti dati riportano che i nati da una tecnica di procreazione assistita abbiano alla nascita un peso inferiore ai 2500 g.

Lo studio relativo al peso dei bambini alla nascita è stato affrontato da L. Schieve nel 2002, egli ha confrontato 42.463 bambini nati con tecniche ART con 3.389.098 bambini nati da concepimento naturale negli Stati Uniti nel 1997. Tenendo conto di tutte le gravidanze, singole e multiple, il rischio di partorire un figlio di peso inferiore a 2.500 g è più alto di 2,6 volte nelle gravidanze ottenute con ART. Se si

prendono in esame le gravidanze singole, il rischio di basso peso alla nascita viene confermato, tranne che nel gruppo delle madri surrogate, che partoriscono bambini di peso normale (L. Schieve et al., 2002). Ciò porterebbe a pensare che sia la madre, non la tecnica, ad avere influenza sul peso del feto alla nascita.

Una metanalisi ed una review, entrambe del 2004, riportano che per i nati ART esiste, un aumento del rischio di mortalità perinatale, di parto pretermine e di maggiore incidenza di LBW ma che non esistano differenze significative tra FIVET e ICSI (R.A. Jackson et al., 2004; F.M. Helmerhost et al., 2004). La questione del peso alla nascita è ancora controversa, di fatti uno studio del 2015, nel topo, riporta che esiste il fenomeno del LBW successivo ad una ART e che esso sia da attribuire ad un particolare imprinting genomico che porta ad un anomalo sviluppo e, quindi anomala funzionalità, della placenta (Shuqiang Chen et al., 2015). Nello stesso anno però in uno studio differente non si osserva alcuna crescita ridotta nei nati da gravidanza singola dopo una IVF (Richard P. et al., 2015).

Se il basso peso alla nascita desta preoccupazioni, la Beckwith-Wiedemann syndrome BWS (sindrome dell'iper-accrescimento fetale) non passa inosservata. Tale malattia genetica è provocata da una disomia uniparentale ed è caratterizzata da iper-accrescimento, predisposizione ai tumori e malformazioni congenite. In una review del 2013 si dimostra che esiste una correlazione positiva tra BWS e IVF/ICSI dimostrando che le procedure IVF / ICSI influiscono per lo più sull'epigenoma. Molti studi dimostrano che vi è, effettivamente, una differenza di imprinting nei bambini nati da IVF ma questo non dipende strettamente dalla tecnica e dal sistema di coltura, quanto dal fatto che il sistema *in vitro* permette il trasferimento e la propagazione di errori, in particolare, nel sistema di metilazione (Vermeiden JP et al., 2013). È

interessante notare, inoltre, che i geni che mostrano una diversità di espressione nei bambini nati da ART sembrano essere quelli coinvolti in disordini metabolici cronici tra cui l'obesità, diabete di tipo II e pressione alta. Questo suggerisce fortemente che l'effetto delle procedure ART potrebbe manifestarsi non solo alla nascita, ma anche alla fine dell'infanzia o nella vita adulta (Stuppia et al., 2015).

C'è da sottolineare una cosa importante, quando si analizzano i dati e le conseguenze sulla salute nei bambini nati da ART le possibilità di d'errore sono molte: i bambini ICSI sono esaminati con una cura particolare e con l'uso di strumentazioni generalmente non richieste, le madri sono spesso più anziane e i genitori presentano anomalie genetiche per questo è ancora non del tutto chiaro, se sia la tecnica ad influire sulla salute del nato o il contesto genitoriale di partenza.

Ciò che è chiaro, oramai, è che sia l'IVF che l'ICSI nel loro complesso rappresentano una fonte di stress ossidativo. Durante una IVF, gli spermatozoi e gli ovociti con le loro cellule del cumulo restano a lungo incubati nel mezzo di coltura e, come già detto in precedenza, sia le cellule del cumulo che i mezzi di coltura sono una fonte di ROS. Al contrario, l'ICSI ha minori tempi di incubazione dei gameti ma rischia di esporre l'ovocita a danni al DNA stress ossidativo-indotti poiché, anche se in minima parte, durante l'iniezione dello spermatozoo si trasferisce una piccola quantità di mezzo (Agarwal et al., 2014) (fig.5).

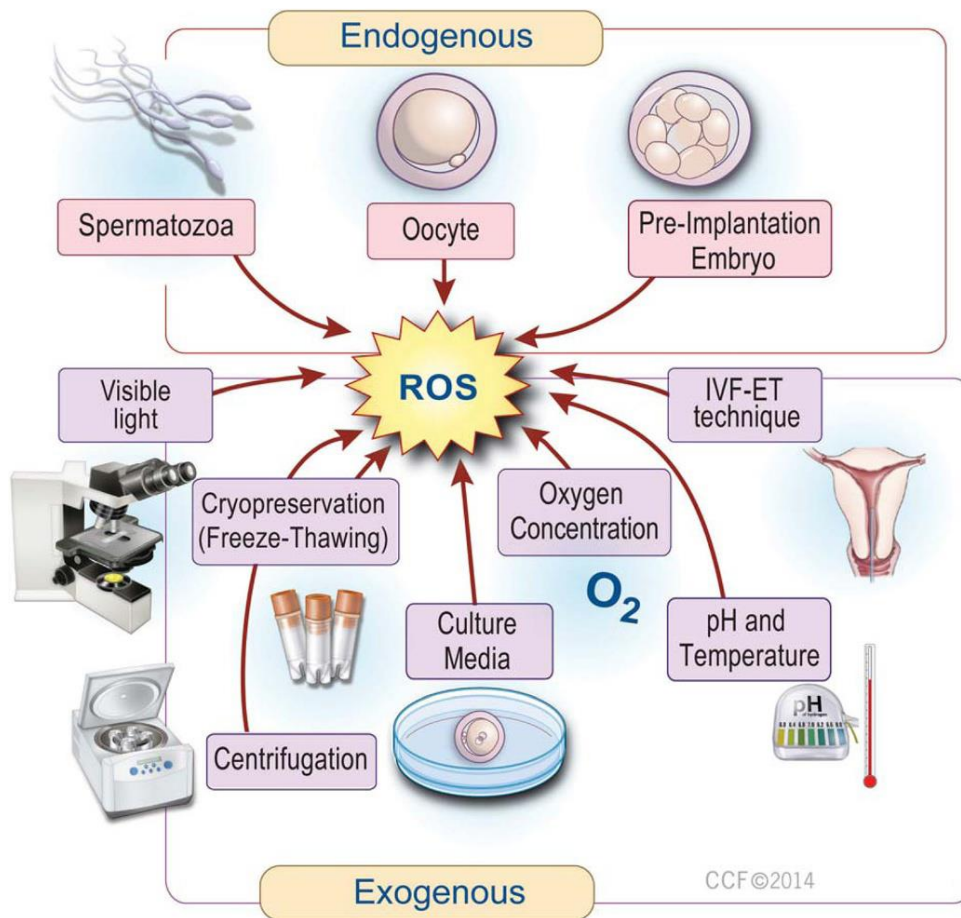


Figura 5: Fonti endogene ed esogene di ROS durante una ART

Stress ossidativo e cellule germinali maschili

Come detto in precedenza, tra le diverse fasi di una procedura ART, la manipolazione dei gameti, ed in particolare degli spermatozoi, può avere conseguenze importanti; diversi lavori dimostrano che lo stato di salute dello spermatozoo condiziona lo sviluppo embrionale pre-impianto, i tassi d'impianto, le interruzioni spontanee della gravidanza e la salute dei nati (Janecka et al., 2017; Robinson et al., 2012). Una delle cause maggiori di disfunzione spermatica è lo stress ossidativo sebbene nel tratto riproduttivo maschile le ROS giochino un ruolo chiave; a livelli fisiologici sono essenziali per la regolazione delle funzioni

spermatiche come la capacitazione, la reazione acrosomiale e la fusione spermatozoo-ovocita (Agarwal et al.,2004). Una sovrapproduzione di ROS, invece, ha un'influenza negativa su vari aspetti della salute spermatica quali: la motilità, l'integrità membranaria e genomica. Tutto ciò, chiaramente riduce il potenziale di fertilità e, soprattutto, l'elevata incidenza di un danno ossidativo al DNA nei pazienti subfertili può avere conseguenze sulla salute dei bambini concepiti *in vitro*.

Lo stress ossidativo, causato da un mancato equilibrio tra radicali liberi e antiossidanti, può essere generato da diversi fattori come raggi X, pesticidi, antibiotici, agenti tumorali ed elementi del fumo di sigaretta o semplicemente dal normale metabolismo aerobico. Questo fenomeno, riassumendo, comporta una serie di disfunzioni nello spermatozoo che influenzano, non solo la sua capacità fecondante, ma anche lo sviluppo e la qualità dell'embrione derivato dall'eventuale fecondazione di un ovocita con uno spermatozoo che ha subito stress ossidativo, riflettendosi, in ultimo, sulla salute del nato. Nello specifico, lo stress ossidativo, inficia la qualità spermatica si ripercuote sui tassi di fecondazione e, soprattutto, ha effetti negativi sulla qualità embrionale in termini di tassi di sviluppo a blastocisti e percentuale di cellule delle blastocisti che presentano DNA frammentato (Talevi et al., 2013; Gualtieri et al.,2014).

Ancora, in letteratura si trovano, difatti, diverse ricerche che dimostrano che fecondazioni con spermatozoi che presentano un danno ossidativo al DNA comportano un aumento del tasso di aborti, di malformazioni congenite ed addirittura un aumento dell'incidenza di cancro nei bambini nati (Aitken et al., 2014).

Gli spermatozoi umani risultano essere molto suscettibili allo stress ossidativo in quanto caratterizzati da: elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi, carenze di enzimi antiossidanti intracellulari e ridotta capacità di riparazione del DNA.

Le specie reattive dell'ossigeno, dunque, sono tra le cause principali dell'infertilità maschile perché agiscono attraverso due meccanismi fondamentali: danneggiano la membrana spermatica attraverso la perossidazione lipidica, con conseguente riduzione della motilità e della capacità di fusione con l'ovocita (Agarwal et al.,2003) ed inducono un danno al DNA spermatico, compromettendo il contributo genomico paterno all'embrione (Aitken et al.,2010) (fig.6).

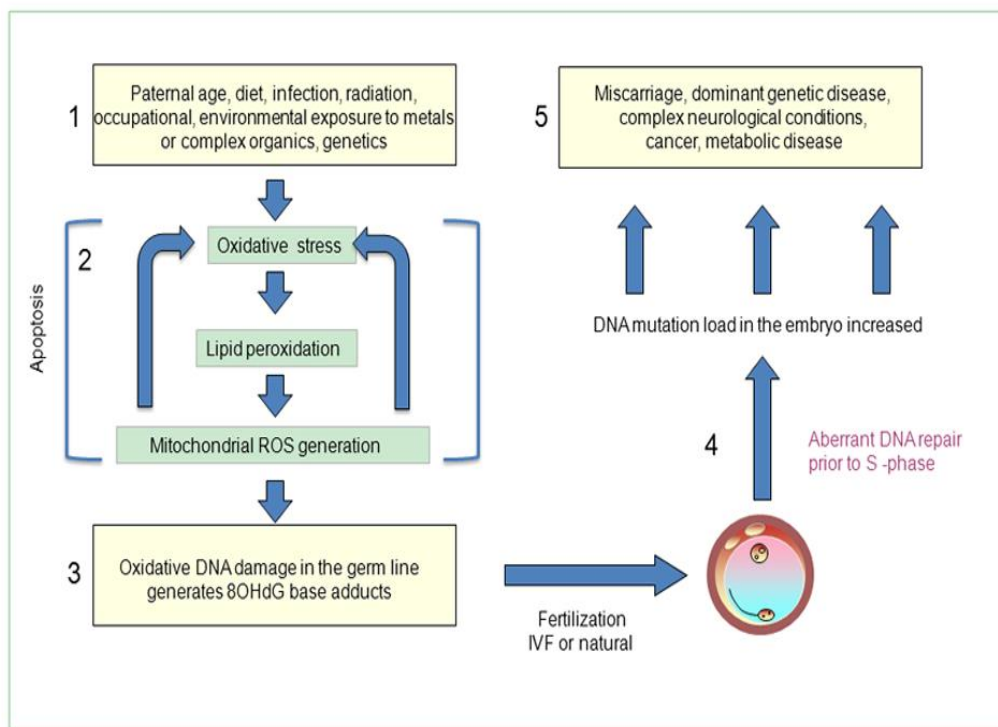


Figura 6: ciclo di cause ed effetti dello stress ossidativo sulla linea germinale maschile e sulla salute delle generazioni future

La conseguenza più allarmante dello stress ossidativo a livello spermatico è proprio la frammentazione genomica. Questa rappresenta un fattore importante nell'eziologia dell'infertilità maschile e potrebbe essere una possibile spiegazione dell'infertilità idiopatica.

Un eccesso di ROS induce infatti la modifica della guanina trasformandola in 8-idrossiguanosina (l'8-OH-dG) che rappresenta uno dei marker principali di danno genomico. La guanina è la base del DNA che presenta il potenziale di ossidazione più basso ed è quindi la più suscettibile agli attacchi degli agenti ossidanti e in particolare delle ROS. Inoltre l'8-OH-dG, se non escissa a livello dello spermatozoo e sostituita con la guanosina durante il riparo del genoma paterno che si ha nello zigote, causa mutazioni genetiche in quanto, invece, di appaiarsi alla citosina si appaia alla timina causando mutazioni G-C T-A nell'embrione (Cooke, 2000). Gli spermatozoi possono avere un grado variabile di frammentazione del DNA e le varie procedure di routine di una pratica ART possono aumentare proprio il livello basale di frammentazione e ciò è stato correlato allo stress ossidativo. Quando si presenta un danno al DNA, lo spermatozoo stesso cerca di ripararlo ma è dotato solo delle tappe iniziali del "base excision repair". Alla fecondazione, lo zigote, quindi, deve riparare il danno genomico, portato nello ovocita dallo spermatozoo, prima dell'avvio della fase S per la prima divisione mitotica. Se lo zigote fa un errore in questa fase di riparazione del DNA si presenta la possibilità che si verifichino mutazioni che saranno presenti, poi, in ogni cellula dell'embrione e che potrebbero spiegare la diversa gamma di patologie (disfunzioni metaboliche, problemi cardiovascolari, cancro) riscontrate nella prole di padri che presentano livelli elevati di danno ossidativo al DNA nei loro spermatozoi (Aitken et al.,2014). Gli

antiossidanti svolgono un ruolo protettivo nei confronti degli spermatozoi (Talevi et al., 2013), un delicato equilibrio tra riduzione e ossidazione è necessario per le funzioni essenziali, tra cui la fecondazione. Ridurre lo stress ossidativo può migliorare le probabilità della coppia di ottenere un concepimento naturale o tramite riproduzione assistita.

L'ossidazione delle basi del DNA, data dall'eccesso di ROS, provoca la formazione di addotti delle basi stesse che alterano la funzione del genoma, influenzando tutti gli eventi successivi che si verificano nei primi stadi di sviluppo embrionale (Kumar et al., 2012). Il contributo paterno è fondamentale per capire i processi di sviluppo embrionale e i loro effetti sulla salute del bambino. Lo spermatozoo non è solo il semplice vettore di materiale genetico, esso partecipa attivamente ai processi di sviluppo perché, durante il processo di fecondazione, trasferisce non solo DNA ma anche fattori di attivazione ovocitaria, indispensabili proprio per la fecondazione, centrosoma, fondamentale per il processo di divisione, e RNA messaggeri di importanza critica per lo sviluppo dell'embrione. Durante la spermatogenesi la cellula spermatica subisce una serie di modifiche epigenetiche che sono fondamentali, non solo, per il processo in sé ma anche per supportare l'eventuale sviluppo embrionale. Per questo i danni al DNA possono riflettersi non solo sulla qualità spermatica ma anche sul destino del feto, in quanto dopo la fecondazione il genoma di origine paterna e materna è soggetto ad un profondo processo di riprogrammazione che potrebbe essere disturbato da danni a monte nel DNA. Per quanto riguarda il genoma paterno, ad esempio, almeno 3 geni imprintati, H19-IGF2, RASGRF, and DLK1-GTL2, risultano indispensabili per lo sviluppo dell'embrione e della placenta. Il sistema *in vitro* è causa di difetti epigenetici nella prole ma molte

evidenze recenti suggeriscono che un ruolo fondamentale è svolto dai difetti epigenetici degli spermatozoi usati durante una ART. Tali danni sono in parte dati dalla non normospermicità dei pazienti che si rivolgono ad un centro ART, dall'altra però possono essere dovuti o, quanto meno, amplificati da tutto l'insieme di processi a cui sono sottoposti gli spermatozoi per poter poi essere utilizzati durante una IVF/ICSI.

Grandissima rilevanza assume lo stile di vita dell'uomo nell'ambito dei cambiamenti epigenetici delle cellule spermatiche. Alterazioni soprattutto nel processo di metilazione sono dovute al fumo di sigarette, all'abuso di alcool, ad esposizione a radiazioni e ad una dieta sregolata. Modifiche allo stile di vita come una maggiore assunzione di frutta e verdura, esercizio fisico, meditazione, yoga, cessazione del fumo di sigaretta e riduzione dell'assunzione di alcool possono migliorare la salute dello spermatozoo e del suo genoma, influenzando positivamente lo sviluppo embrionale e la salute della prole (Stuppia et al., 2015). Durante una procedura ART, però, i danni estrinseci agli spermatozoi potrebbero essere particolarmente critici perché tutti i meccanismi di selezione naturali sono bypassati (fig.7).

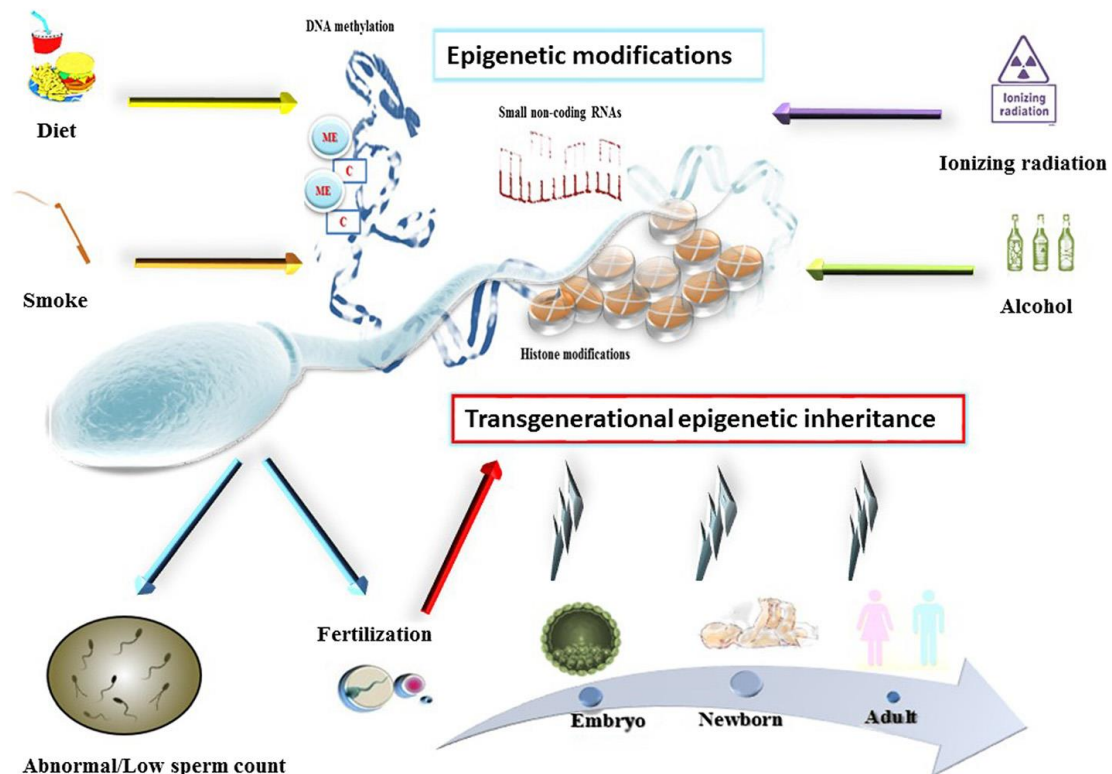


Figura 7: Alterazioni epigenetiche e il loro effetti sulla salute spermatica, sullo sviluppo embrionale e sulla salute del nato

Prevenzione della fertilità in pazienti oncologiche

Come già detto, le tecnologie di riproduzione assistita stanno diventando una pratica clinica sempre più frequente perché sia per ragioni mediche che sociali la richiesta da parte delle coppie aumenta. Nel caso delle pazienti oncologiche, i recenti progressi raggiunti in campo diagnostico e nei trattamenti radio- e chemio-terapici hanno favorito un aumento della loro sopravvivenza (von Wolff et al., 2009). Tuttavia, la citotossicità delle terapie oncosoppressive si riflette in un'elevata probabilità di menopausa precoce (Blatt, 1999), nel senso che il 100% delle pazienti dopo remissione del tumore avrà una riserva ovarica annullata o quanto meno danneggiata.

L'esigenza di preservare la fertilità delle donne nasce dal presupposto che il numero di cellule germinali è predeterminato dalla nascita e diminuisce gradualmente nel corso della vita. Infatti, durante lo sviluppo embrionale, le cellule germinali proliferano e raggiungono un numero massimo (6-7milioni) a 20 settimane di gestazione (Baker et al.,1963; Mamsen et al.2011). Questo numero si riduce alla nascita, a causa di atresia, a 1 milione, e a 400.000 ovociti intorno la pubertà. Durante la vita riproduttiva, questo numero finito di ovociti, che rappresenta la riserva ovarica, diminuisce ulteriormente ad ogni ciclo ovarico, raggiungendo infine un numero di 1.000 al momento della menopausa (Faddy et al., 1996; Wallace et al., 2010). La funzione endocrina e la fertilità dipendono dal reclutamento ciclico e dallo sviluppo di ovociti nella riserva ovarica. Il follicolo ovarico secerne ormoni, che sono necessari non solo per lo sviluppo e la fertilità dell'ovocita, ma anche per la funzione endocrina, che incide su altri sistemi, come ad esempio il sistema cardiovascolare e il tessuto osseo. La preservazione della riserva ovarica, quindi, è necessaria per garantire la salute delle donne. Chemioterapie e radioterapie, che sono essenziali per eliminare le cellule tumorali, impediscono la sopravvivenza degli ovociti nelle ovaie. L'ambiente tossico influisce negativamente sugli ovociti della riserva ovarica, causando morte o attivazione anomala dell'atresia, tutto questo si traduce in una deplezione dei follicoli ovarici e in squilibri ormonale (Morgan et al.,2012; Howell et al., 2001). Il grado di esaurimento dei follicoli ovarici, causati dal trattamento del cancro, dipende dalla dose e dal tipo di chemioterapia e radioterapia. Ci sono differenti strategie per preservare la fertilità in pazienti oncologiche. Attualmente, l'unica opzione validata, come riportato dalla Società Americana di Medicina Riproduttiva (2005), è la crioconservazione di embrioni (Oktay et al.,

2003, 2005; Juretzka et al., 2005; Seli et al., 2005). Nelle donne con il cancro, le strategie di preservazione della fertilità includono stimolazione ovarica controllata (COS), seguita da pick up degli ovociti, che possono essere direttamente crioconservati o fecondati *in vitro* (IVF) per la produzione di embrioni (Jeruss et al., 2009). Un'altra opzione sperimentale è la crioconservazione del tessuto ovarico, che può essere utilizzato, poi, in un secondo momento per il trapianto. Tuttavia, ciascuna di queste opzioni presenta vantaggi e svantaggi e non è percorribile in tutti i casi.

La crioconservazione degli ovociti è un'interessante tecnica in quanto elimina la necessità di un intervento chirurgico ed è adatta a donne che non hanno un partner e che non desiderano conservare embrioni per motivi religiosi o etici (Lee et al.,2006; McLaren et al.,2012). La crioconservazione degli ovociti richiede una stimolazione ovarica, che può avere la durata anche di diverse settimane e quindi non è un'opzione per le donne con tumori aggressivi, che necessitano di un trattamento immediato, o tumori estrogeno-sensibili o, ancora, per bambine prepuberi nelle quali la produzione di ovociti maturi non è ancora iniziata (Kim et al.,2016). In seguito alla stimolazione ovarica, gli ovociti vengono prelevati mediante pick-up, cioè attraverso un'aspirazione transvaginale sotto controllo ecografico e possono essere crioconservati come ovociti maturi in metafase II (MII) o come ovociti immaturi nella fase di vescicola germinale (GV) (Kim et al.,2016). In generale, esistono due procedure per la crioconservazione, congelamento lento e vitrificazione; il congelamento lento consiste in una controllata disidratazione della cellula in presenza di uno o più soluzioni contenenti crioprotettori. L'azione di questi ultimi è quella di ridurre la quantità di acqua, che potrebbe trasformarsi in ghiaccio, sostituire l'acqua intracellulare così da facilitare la conversione del citoplasma in uno stato

amorfo ed abbassare il punto di congelamento di una soluzione, interferendo con il processo di cristallizzazione. L'ovocita, pronto per il congelamento, viene lentamente raffreddato (a $-0.38^{\circ}\text{C} / \text{min}$) fino a -30°C e poi rapidamente portato (a $-50^{\circ}\text{C} / \text{min}$) a -150°C prima di essere immerso in azoto liquido (Woods et al., 2004). La vitrificazione, invece, è un metodo di crioconservazione che utilizza elevate concentrazioni di crioprotettori altamente tossici e un congelamento ultrarapido per contatto diretto con azoto liquido che evita la formazione dei cristalli di ghiaccio. Oggi questo è il metodo più diffuso perché garantisce, rispetto al metodo di congelamento lento, una migliore sopravvivenza ovocitaria così come migliori tassi di fecondazione (Saragusty J et al., 2011). Tecnicamente, la crioconservazione degli ovociti è più difficile rispetto a quella degli embrioni, a causa delle loro grandi dimensioni e all'elevato contenuto di acqua che rende gli ovociti più inclini ai criodanni. Tuttavia, negli ultimi anni, ci sono stati notevoli progressi nelle tecniche di crioconservazione di questi tipi di cellule, che hanno permesso al 70-90% degli ovociti crioconservati di sopravvivere al processo di congelamento-scongelo (Donnez et al., 2006). Dopo la crioconservazione, quando la donna è pronta a perseguire la realizzazione di una famiglia, gli ovociti vengono scongelati e fecondati *in vitro*.

La crioconservazione degli embrioni è considerata l'opzione "gold standard" di conservazione della fertilità. Gli embrioni sono altamente resistenti ai danni da congelamento e i tassi di sopravvivenza e di impianto sono, rispettivamente, di oltre il 90% e il 30% e i tassi di nati vivi dopo trasferimento embrionale sono pari al 20% (Mandelbaum et al., 1998; Senn et al., 2000). L'intera procedura richiede stimolazione ovarica controllata, recupero degli ovociti mediante pick up,

fecondazione *in vitro* con liquido seminale del partner o di un donatore e crioconservazione dell'embrione formato (Senn et al.,2000). Anche in questo caso la crioconservazione si realizza attraverso congelamento lento o per vitrificazione. Questo tipo di tecnica prevede però che la donna abbia un compagno o che comunque sia disposta a rivolgersi ad un donatore, inoltre come già accennato, la crioconservazione degli embrioni solleva rilevanti problemi etici soprattutto nel caso in cui ci si ritrova con embrioni abbandonati.

La crioconservazione del tessuto ovarico, al contrario di quella degli ovociti e degli embrioni, non richiede COS o un ritardo dell'inizio della oncoterapia, non c'è bisogno di un partner o di donatore ed è, attualmente, l'unica opzione disponibile per le bambine in età prepubere; inoltre, la biopsia ovarica può essere recuperata, in qualsiasi momento, tramite un intervento poco invasivo in laparoscopia. La crioconservazione del tessuto comporta dapprima la raccolta del tessuto ovarico e poi il congelamento, permettendo la conservazione degli ovociti presenti nei follicoli primordiali, localizzati nel cortex dell'ovaio. Questo rappresenta un ulteriore vantaggio, in quanto i follicoli primordiali sono molto resistenti alle procedure di congelamento/scongelo. Per il congelamento la procedura di preparazione da eseguire è la seguente: la corticale ovarica, dopo essere stata selezionata dalla porzione midollare viene recisa e in seguito viene ulteriormente tagliata in strisce ultra-sottili ($\sim 10 \times 5 \times 1$ mm ciascuno), fette ($\sim 4 \times 2 \times 1$ mm ciascuno), o cubetti (~ 2 mm³ ciascuno). La sottigliezza delle parti corticali ovariche, è essenziale non solo per una corretta perfusione di crioprotettori, ma anche per un'efficiente rivascularizzazione dopo l'autotrapianto (Mahmoud et al.,2015). Si passa poi alla crioconservazione vera e propria; fino ad oggi, il metodo standard per il

congelamento del tessuto ovarico, è stato quello del congelamento lento; tuttavia è incoraggiata anche la vitrificazione grazie ai suoi risultati promettenti (Isachenko et al., 2009). Dopo la remissione dalla malattia, poi, si può agire in due modi:

- attraverso l'auto trapianto del tessuto scongelato in siti ortotopici o eterotopici
- attraverso l'isolamento dei follicoli dal tessuto scongelato per la crescita *in vitro*, la maturazione e la successiva fecondazione, questa procedura però è ancora in fase sperimentale e non ancora clinicamente applicata.

Il trapianto ortotopico è il trapianto del tessuto corticale ovarico in siti pelvici come l'ovaio stesso, questo tipo di trapianto ha il vantaggio di consentire la ripresa naturale delle funzioni sia endocrine che riproduttive dell'ovaio, così da garantire l'adeguato sviluppo follicolare (Demeestere et al., 2009; Sonmezer et al., 2010; Gamzatova et al., 2010). Nel trapianto eterotopico, invece, il tessuto ovarico viene trapiantato in siti diversi da quelli della cavità pelvica come ad esempio il muscolo pettorale, parete addominale, e l'avambraccio (Demeestere et al., 2006; Oktay et al., 2004; Rosendahl et al., 2006). Ad oggi, ci sono stati almeno 86 nati vivi dopo reimpianto di tessuto ovarico (Jensen et al., 2017). Il più grande rischio della criopreservazione del tessuto ovarico seguita da autotrapianto delle strips congelate è la possibilità di reintrodurre cellule maligne e quindi la possibilità che nella paziente si ripresenti la malattia.

Sia la crioconservazione degli embrioni che quella degli ovociti, dunque, non sono applicabili in pazienti pre-puberi, in pazienti che hanno tumori estrogeno-sensibili o che devono ricorrere immediatamente a trattamenti oncosoppressivi. Inoltre, nel caso della crioconservazione embrionale l'ulteriore limite risiede nella necessità di un partner o di un donatore. La preservazione della riserva ovarica durante i trattamenti

citotossici stessi diventa, dunque, la nuova frontiera nell'ambito della preservazione della fertilità in pazienti oncologiche.

Le terapie farmacologiche

La chemioterapia include agenti alchilanti come il cisplatino che formando dei cross links nel DNA innesca una cascata di eventi che attiva P63 responsabile dell'apoptosi cellulare (Gonfoloni et al.,2009). Il meccanismo preciso, con cui il cisplatino agisce sul pool di follicoli primordiali, non è del tutto chiaro. Studi recenti suggeriscono un ruolo nell'attivazione piuttosto che nell'apoptosi dei follicoli primordiali, tramite upregulation della via di segnalazione PI3K / PTEN / Akt (Chang et al.,2015). Il cisplatino, così, provoca l'apoptosi dei follicoli in maniera progressiva, con conseguente esaurimento della riserva ovarica (Morgan et al.,2013). Diversi lavori dimostrano che l'utilizzo di inibitori delle tirosina chinasi può ridurre l'effetto tossico del cisplatino attraverso l'inibizione di c-Abl che a sua volta promuove l'accumulo di P63 (Gonfloni et al., 2009-2010; Livera et al.,2008). Uno dei maggiori inibitori sperimentati è l'Imatinib, soggetto, però, di numerose controversie poiché in letteratura si trovano dati contrastati circa il fatto che l'Imatinib stesso possa avere effetti deleteri a livello ovarico. Morgan et al., insieme a Maiani et al., e Schultheis et al., trovano che tale inibitore non induca alcun danno ovarico e che, inoltre, protegga da quelli indotti da cisplatino (Morgan et al., 2013; Maiani et al., 2012 Schultheis et al., 2012); al contrario Kerr et al., trova che l'Imatinib non abbia alcun effetto protettivo e che sia addirittura responsabile, esso stesso, di alcuni danni (Kerr et al., 2012). Il ruolo del pathway PI3K/PTEN/Akt nel controllo dello sviluppo follicolare e ovocitario è ben descritto in numerosi lavori, così come il suo coinvolgimento nel cancro ovarico quando alcuni dei suoi

intermediari sono iper-espressi (Cecconi et al.,2012; Cheaib et al., 2015). In particolare la serina treonina chinasi Akt determina la transizione dei follicoli primordiali dallo stato di quiescenza alla fase di crescita, quindi l'idea di bloccare il pathway PI3K/PTEN/Akt in uno dei suoi punti cruciali, ovvero Akt, potrebbe essere una valida alternativa per preservare la riserva ovarica, impedendo così che l'attivazione non controllata della crescita follicolare da parte del cisplatino riduca in maniera irrimediabile la fertilità femminile.

Come gran parte degli aspetti della biologia riproduttiva, anche la preservazione della fertilità non è esente da considerazioni etiche. L'utilizzo di una terapia farmacologica che contrasti gli effetti collaterali dei chemioterapici sembrerebbe la soluzione ottimale per le pazienti oncologiche che desiderano una maternità, purtroppo però, anche in questo caso gli effetti dei farmaci stessi potrebbero presentarsi molto avanti nel tempo; sono quindi necessari numerosi studi per capire in che modo tali farmaci possano influenzare la qualità ovocitaria e se, addirittura, possano avere qualche conseguenza durante lo sviluppo embrionale e nei nati per i quali saranno, poi, necessari studi di follow up ben descritti.

Parte sperimentale

Recenti studi, nell'ambito dell'andrologia e della biologia della riproduzione, hanno evidenziato il potente ruolo svolto dallo stress ossidativo nell'indurre danni alla struttura e alla funzionalità degli spermatozoi nel seme umano. In letteratura sono riportati numerosi fattori che *in vivo* vanno ad alterare la qualità spermatica, come la dieta, lo stile di vita, l'abuso di sostanze stupefacenti, l'alcool, il fumo, difetti nella morfologia spermatica, o residui di gocce citoplasmatiche, riflettendosi sui tassi di gravidanza e su possibili effetti sullo sviluppo embrionale e, sulla salute

dell'individuo adulto. Per capire come lo stress ossidativo possa influenzare negativamente la fecondazione, lo sviluppo embrionale ed anche esercitare effetti a lungo termine sui nati, è necessario capire in che modo i fattori esterni possano indurre danni iatrogeni agli spermatozoi durante le ART.

Sarebbe interessante, quindi, anche incrementare i dati derivanti dalla sperimentazione *in vitro*, andando a studiare come le procedure di handling, effettuate nei centri di PMA, vadano ad intaccare la qualità e la funzionalità del seme, in particolare.

Recenti evidenze, infatti, hanno dimostrato che trattamenti attuati sui gameti, prima di effettuare una tecnica ART, possono avere conseguenze deleterie sulla qualità dei gameti stessi, sulla loro competenza a garantire una gravidanza, sullo sviluppo embrionale, nonché sullo stato di salute dei nati, sia a breve e che a lungo termine (Muriel et al., 2006). Le varie manipolazioni *in vitro*, attuate durante le pratiche ART in un centro di PMA, rappresentano, dunque, una fonte di stress per le cellule spermatiche. È stato dimostrato, infatti, quanto alcuni trattamenti degli spermatozoi, che comunemente vengono effettuati durante la ART, possano causare uno stress ossidativo che non influenza i tassi di fecondazione ma, piuttosto, ha effetti negativi sulla qualità embrionale in termini di numero medio delle cellule e di percentuale di nuclei con DNA frammentato, e quanto, poi, l'utilizzo di antiossidanti, che contrastano lo stress, preservi la qualità spermatica influenzando positivamente, proprio, sulla qualità embrionale (Gualtieri et al., 2014).

Dai lavori precedentemente citati si evince che una serie di parametri di qualità spermatica, quali: vitalità, motilità e frammentazione del DNA, possono essere influenzati da fattori come pH, centrifugazioni e luce. In questo contesto si inserisce

la parte sperimentale del mio lavoro di dottorato che ha previsto lo studio delle diverse fasi di preparazione e manipolazione del seme, fondamentali delle pratiche ART, in cui si riscontra un maggior stress ossidativo associato alle conseguenze prima descritte; tale fase è, quindi, stata dedicata allo studio della qualità spermatica nell'uomo. Con l'ausilio del modello animale bovino, poi, una seconda parte sperimentale è stata indirizzata allo studio delle conseguenze sulla qualità embrionale di ovociti fecondati con spermatozoi che hanno subito un danno ossidativo, in virtù del fatto che come, già affermato in precedenza, le manipolazioni degli spermatozoi per le normali pratiche ART inducono un sensibile stress ossidativo in tali cellule e che ciò ha conseguenze anche sull'embrione.

Nello specifico, nella prima parte, ho indagato l'effetto della temperatura (temperatura ambiente vs 37°C), su seme fresco e selezionato mediante swim up e, ancora, l'effetto di diverse concentrazioni spermatiche su cinetica, frammentazione genomica e vitalità. La cinetica è stata analizzata mediante il sistema computerizzato SCA, mentre vitalità e frammentazione genomica mediante tecniche di fluorescenza.

Nella seconda parte, invece, ho concentrato la mia attenzione sull'indagine dell'effetto del pretrattamento degli spermatozoi con antiossidanti seguito dall'induzione di un danno ossidativo esogeno mediante l'utilizzo del sistema Xantina- Xantina Ossidasi, il quale producendo l'anione superossido e il perossido d'idrogeno, è dimostrato indurre stress ossidativo proprio alle cellule spermatiche e sono andata a valutare come tale stress potesse influenzare la qualità embrionale se questi stessi spermatozoi veniva usati per una fecondazione (S.C. Roy et al., 2008).

Nell'ambito poi della biologia riproduttiva si inserisce un tema estremamente attuale, quello della preservazione della fertilità in pazienti oncologiche. Le nuove terapie

hanno permesso un aumento della sopravvivenza alla “malattia del secolo”, si pone quindi, ora, l’attenzione sul come rimediare agli effetti collaterali delle terapie stesse. In ultimo, quindi, in una terza parte sperimentale, svolta presso The University of Edinburgh, ho studiato nel modello murino se l’inibizione della via di segnalazione PI3K / PTEN / Akt potesse proteggere l’ovaio contro i danni indotti dalle terapie chemioterapiche, in particolare dal cisplatino.

MATERIALI E METODI

Spermiogramma

Lo spermiogramma è l'analisi del liquido seminale finalizzata a valutare la qualità degli spermatozoi. L'esecuzione dello spermiogramma prevede una valutazione macroscopica ed una microscopica. La prima esamina volume, aspetto, pH, fluidificazione e viscosità, mentre la seconda valuta concentrazione, motilità, morfologia, presenza di agglutinazione tra gli spermatozoi stessi e presenza di altri elementi cellulari. Prima di eseguire lo spermiogramma si procede con un'anamnesi del paziente, si valuta la sua storia clinica, giacché operazioni e cure mediche particolari possono influenzare la qualità del liquido seminale. La raccolta del liquido seminale avviene, ordinariamente, con la masturbazione rispettando un periodo di astinenza di 3-5 giorni, si usa un contenitore a collo largo sterile. Il liquido seminale deve essere raccolto presso il laboratorio o vi deve essere portato quanto prima per essere esaminato entro 1h dall'emissione. Dopo l'eiaculazione, il liquido seminale subisce un processo di coagulazione e successivamente di fluidificazione che si completa in un tempo che va dai 10 ai 60 minuti. Il campione, pronto per essere esaminato, viene posto su di una piastra riscaldata a 37°C e si prosegue con l'analisi macroscopica. Mediante una pipetta sierologica si procede con la misurazione del volume, secondo i recenti parametri della World Health Organization (WHO) 2010, per definire una condizione di normospermia, il volume del liquido seminale deve essere circa 1.5 ml (1.4-1.7). Lasciando poi cadere goccia a goccia il liquido seminale dalla sierologica si apprezza la viscosità, quando tra due gocce di liquido si forma un filamento di circa 2 cm vi è una condizione di forte viscosità. Una goccia di

campione viene, successivamente, posta su cartine indicatrici specifiche per la valutazione del pH (≥ 7.2 secondo criteri WHO 2010). Si conclude l'analisi macroscopica con la valutazione dell'aspetto che deve essere *proprio, opalescente e avorio*, questo tipo di valutazione dipende dalla sola osservazione dell'operatore che effettua lo spermioγραμμα. Il campione viene, poi, sottoposto ad una valutazione microscopica. La concentrazione viene stimata mediante una conta con una camera particolare chiamata *Camera di Burker*. I recenti parametri WHO indicano come non patologica una concentrazione di circa 15 milioni di spermatozoi per millilitro. La motilità viene analizzata mediante il sistema computerizzato *Sperm Class Analyzer* (SCA), tramite ausilio di una *camera di Mackler*. Per quanto riguarda la motilità l'organizzazione mondiale della sanità stabilisce i seguenti valori:

Motilità totale (PR+ NP, %): 40 (38-42)

Motilità progressiva (PR, %): 32 (31-34)

L'analisi completa del liquido seminale prevede, infine, la valutazione della morfologia degli spermatozoi. Gli spermatozoi vengono strisciati su vetrino, lasciati essiccare a temperatura ambiente e vengono colorati con la metodica Diff-Quick. La colorazione prevede tre passaggi, ognuno di 10-15". Il primo prevede l'utilizzo di una soluzione fissativa a base di *metanolo*, a cui segue un trattamento con una soluzione di *eosina* (tetrabromofluoresceina) che agisce colorando il citoplasma, e infine un ultimo passaggio in una soluzione di *tiazina blu* che colora i nuclei. In seguito a tale processo di colorazione si procede all'osservazione al microscopio ottico; una stima significativa richiede l'osservazione di almeno 100 spermatozoi. In relazione ai recenti parametri WHO riguardo la morfologia, si ritiene teratospermico un campione che possiede meno del 4 % di forme normali.

Camera di Bürker

La camera di Bürker permette un conteggio statico degli spermatozoi, in quanto la popolazione spermatica viene diluita 1:100 in acqua e le cellule appaiono immobili al fondo della lastra di vetro. Gli spermatozoi, infatti, in seguito allo shock osmotico, determinato dalla diluizione in acqua, risultano tutti non vitali. La camera presenta un reticolo sul fondo, costituito da 9 quadrati grandi, delimitati da tre linee parallele, con all'interno quadrati e rettangoli più piccoli, delimitati da due linee parallele (Fig.8).

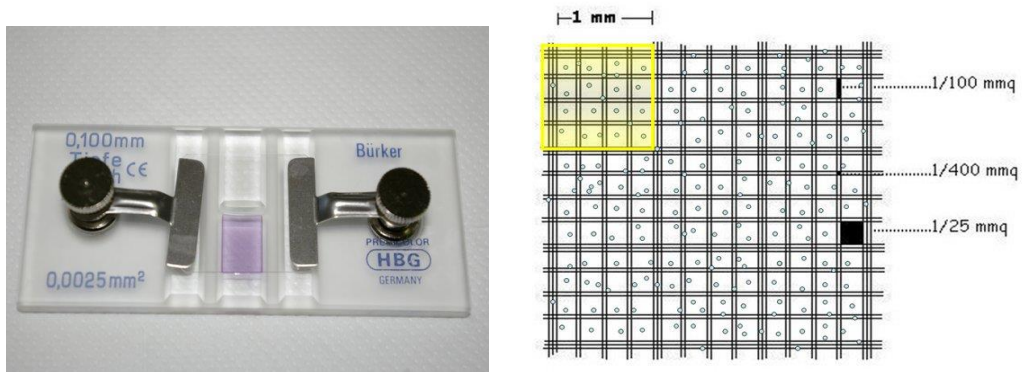


Figura 8: Camera di Bürker

I quadrati grandi rappresentano le aree di conta e hanno una superficie di 1 mm^2 . Tra il fondo della camera ed il vetrino copri-oggetto, trattenuto dalle apposite alette metalliche, vi è uno spessore di 0.1 mm , per cui ad ogni quadratino corrisponde un volume di $0.1 \text{ }\mu\text{l}$. Dalla soluzione spermatica diluita vanno prelevati $10 \text{ }\mu\text{l}$ e con questo volume va riempito per capillarità lo spessore tra il fondo della camera e il vetrino copri-oggetto. L'osservazione va effettuata al microscopio ottico. Si contano gli spermatozoi contenuti all'interno di uno stesso quadrato grande e quelli presenti su 2 dei 4 lati delimitati dalle 3 linee parallele. La conta va ripetuta anche in altri

quadrati grandi e il numero di spermatozoi sarà quindi calcolato come media delle singole conte e moltiplicato per un fattore di 10^6 (10^4 fattore di Bürker x 10^2 fattore di diluizione); pertanto il numero di spermatozoi sarà espresso in milioni di cellule per ml di soluzione.

Camera di Makler

La camera di Makler è una camera di conta spessa 10 micrometri. E' costituita da due vetri piatti, quello superiore serve da copri vetrino e presenta nel mezzo una griglia di 1 mm^2 di area suddivisa in 100 quadratini di $0.1 \times 0.1 \text{ mm}$ ognuno. La spaziatura di $10 \text{ }\mu\text{m}$ è mantenuta costante grazie a 4 piedini di quarzo (Fig.9).



Figura 9: Camera di Makler

La conta viene effettuata contando gli spermatozoi motili e quelli non motili in 10 quadratini (scelti arbitrariamente). Una piccola goccia di campione non diluito, subito dopo la fluidificazione, viene posta nel centro della camera di conta e immediatamente coperta, si procede poi all'osservazione e alla conta al microscopio ottico con un obiettivo 10X. La percentuale di motilità viene calcolata con la seguente formula:

$\% = (\text{motili} / \text{motili} + \text{immotili}) \times 100.$

Solitamente questa operazione viene effettuata in automatico da un Software (SCA) tramite un computer munito di videocamera, collegato al microscopio a contrasto di fase.

Sperm Class Analyzer (SCA)

In commercio si trovano svariati sistemi che utilizzano l'analisi di immagini digitalizzate per la valutazione automatica della concentrazione, della motilità e delle caratteristiche del movimento degli spermatozoi. Un sistema per l'analisi quantitativa e la gestione dei parametri più importanti del seme umano. Il sistema Sperm Class Analyzer (SCA) è un sistema automatico, oggettivo e standardizzato, che permette di valutare la concentrazione, la motilità, la morfologia e la vitalità in un campione di eiaculato. Il sistema SCA negli anni è stato principalmente testato sull'uomo, soprattutto nei centri di fertilità, provando a valutare la qualità degli spermatozoi da impiegare nella fecondazione *in vitro* per correlare tale qualità, in termini di motilità e morfologia, con la fertilità.

Il sistema SCA standardizza tutti i parametri degli spermatozoi e soprattutto valuta la motilità nelle forme indicate dal WHO:

- tipo "a" (motilità progressiva lineare)
- tipo "b" (bassa motilità progressiva)
- tipo "c" (motilità non progressiva)
- tipo "d" (immobili).

Tale sistema consiste in un'attrezzatura specializzata che include un microscopio a contrasto di fase, una videocamera ad alta risoluzione, un videoregistratore, un monitor, un computer dotato di un software specifico per la gestione dei dati, un

tavolinetto termostato, in grado di garantire una temperatura costante agli spermatozoi da analizzare, ed una stampante. L'analisi della sospensione spermatica viene effettuata utilizzando una camera di Makler, precedentemente riscaldata; quindi si passa all'osservazione al microscopio. Dal microscopio l'immagine viene trasferita, mediante la videocamera, al monitor dove può essere controllata dall'operatore; dal monitor l'immagine viene poi inviata al software di elaborazione del computer, il quale trasforma l'immagine reale in traccia elettronica (digitalizzazione). La digitalizzazione è il processo con cui pixels video (punti costituenti un'immagine) vengono codificati come numeri. L'immagine più semplice monocromatica possiede solo due colori, bianco e nero, in modo che i pixels possono essere on oppure off. Questo processo viene indicato come "digitalizzazione binaria". Se un'immagine monocromatica comprende un'ombra di grigio, ciascun pixel ha un valore numerico nella scala dei grigi che può avere 256 livelli (0=nero; 255=bianco). È possibile, ovviamente, un ampio margine di errore quando si determina la soglia ottimale della testa degli spermatozoi per ottenere la massima distinzione fra le teste degli spermatozoi e il fondo. Se il settaggio è troppo lontano in un senso, molti piccoli detriti presenti nel fondo saranno digitalizzati come oggetti spuri. Si possono quindi verificare errori nella classificazione degli oggetti, dovuti ai criteri utilizzati per il settaggio. L'immagine digitalizzata dello spermatozoo è costituita da un contorno che appare sul monitor accanto alla cellula osservata in real-time. I contorni vengono messi a fuoco grazie al controllo del "threshold" (toni di grigio). La scelta del threshold permette all'operatore di eliminare le immagini del materiale particellato più piccolo, il cui effetto di disturbo può essere ulteriormente attenuato inserendo un filtro di fondo. Le coordinate digitalizzate dei pixels che

definiscono i contorni di ogni testa di spermatozoo sono trasmesse ad un personal computer che provvede a determinare la posizione del suo centroide, ossia la posizione media definita da due coordinate x e y di un gruppo di pixels. Dalla serie di immagini, ciascuna contenente un numero di centroidi, il programma SCA deve plottare il movimento di ciascun oggetto, che è stato identificato come testa di spermatozoo, da un frame al successivo, attraverso l'intera sequenza. La creazione di queste "traiettorie" viene raggiunta definendo la massima distanza che uno spermatozoo può aver compiuto tra un frame e il successivo. Questa distanza massima, che viene calcolata da una velocità massima fornita al programma, viene, quindi, divisa per la velocità dei video frames, per definire il raggio di una circonferenza che è disegnata intorno alla testa dello spermatozoo in un determinato video frame, successivamente proiettato nel video frame seguente. Ogni centroide, che cade in questo cerchio, viene considerato il centroide della cellula che era stato proiettato dall'immagine video precedente. I due centroidi sono uniti a formare una traiettoria (Figura 10). Questo procedimento viene ripetuto per tutta la sequenza dei video frames per ricostruire la traiettoria della cellula in esame. Quando il centroide non si muove tra frames successivi, viene considerato non motile. Un programma, di solito, richiede assenza di movimento per 3-4 video frames, prima di considerare la cellula come immotile.

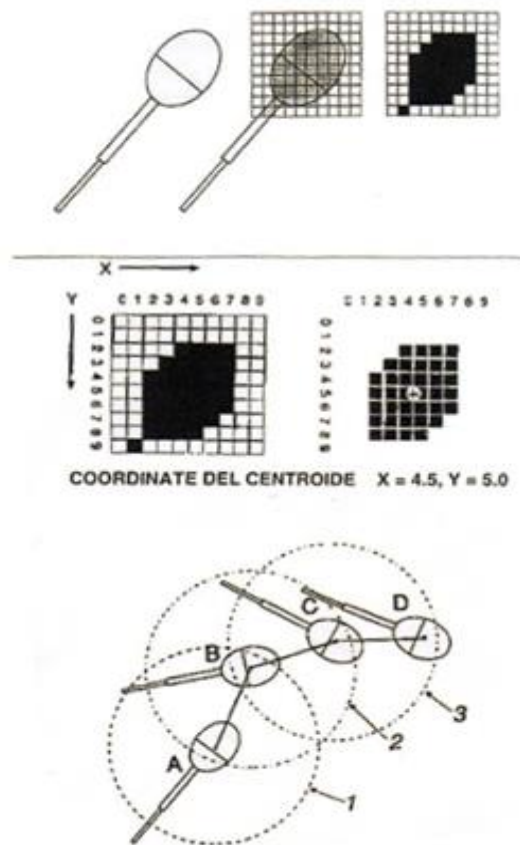


Figura 10: Sperm Class Analyzer

Le caratteristiche cinetiche che derivano dall'analisi del centroide della testa sono

- *Velocità curvilinea (VCL)*: la velocità curvilinea (VCL) è calcolata sommando tutti i segmenti determinati dalle successive posizioni della testa lungo tutto il tragitto compiuto dallo spermatozoo. In questo modo, la velocità curvilinea costituisce la proiezione a due dimensioni della reale traiettoria tridimensionale elicoidale dello spermatozoo, come viene rilevata dal tempo di risoluzione della metodica di immagine utilizzata. I valori della VCL sono espressi in $\mu\text{m/s}$ con un decimale.

- *Velocità lineare (VSL)*: la velocità lineare (VSL) rappresenta la velocità di progressione della cellula. Viene determinata dal punto di partenza a quello di arrivo della traiettoria che viene esaminata. I valori di VSL sono espressi in $\mu\text{m/s}$.
- *Velocità media della traiettoria (VAP)*: la velocità media della traiettoria (VAP) è la velocità con cui lo spermatozoo compie il tragitto medio. Dal momento che la traiettoria media può essere determinata in vari modi, compresa l'interpolazione visiva, il metodo utilizzato per la sua determinazione deve essere sempre indicato con precisione. I suoi valori sono espressi in $\mu\text{m/s}$, con l'aggiunta di un decimale.

Possono essere determinati tre indici di progressione, espressi come percentuale:

1. Linearità (LIN): $VSL/VCL \times 100$
2. Rettilinearità (STR): $VSL/VAP \times 100$
3. Oscillazione (WOB): $VAP/VCL \times 100$

- *Ampiezza dello spostamento laterale della testa (ALH)*: l'ampiezza dello spostamento laterale della testa dello spermatozoo (ALH) viene calcolata sulla base delle ampiezze delle deviazioni laterali, rispetto all'asse di progressione della cellula. I valori di ALH sono espressi come la larghezza lungo tutto il tragitto in μm con l'aggiunta di un decimale.
- *Frequenza dei battiti (della coda)*: la frequenza dei battiti della coda nemaspermica (BCF) è il numero delle volte che la traiettoria curvilinea attraversa la traiettoria media per unità di tempo. Le osservazioni sul battito della coda sono di fondamentale importanza per la descrizione della motilità iperattivata degli spermatozoi.

Non mancano in un sistema computerizzato così complesso fonti di errori che portano a un falso risultato.

In generale gli errori maggiori riguardano il riconoscimento dell'oggetto e il movimento.

- *Riconoscimento dell'oggetto:* in relazione alla grandezza e talora alla forma, l'oggetto (digitalizzato) è considerato come testa di spermatozoo o come oggetto diverso. Se due o più teste nemaspermiche sono in contatto o molto vicine tra loro, potranno essere digitalizzate come un singolo oggetto che, risultando troppo grande per essere considerato come testa di un singolo spermatozoo, sarà eliminato dall'analisi. Inoltre, detriti rifrangenti con dimensioni simili a quelle di una testa di uno spermatozoo, verranno erroneamente considerati come teste nemaspermiche. Questi problemi, comuni a tutti i sistemi computerizzati attualmente disponibili, si traducono in una erronea valutazione della concentrazione spermatica.
- *Movimento:* se due spermatozoi entrano in collisione, essi si ostacoleranno reciprocamente nel loro movimento. Lo stesso problema si presenterà qualora lo spermatozoo contatti grossi frammenti di detriti o un'altra cellula. Questo sistema che elimina le cellule dall'analisi che entrano in collisione o si avvicinano alla stessa posizione, commette errore, in quanto viene fatta una sottostima della concentrazione nemaspermica. La conseguenza di questi "algoritmi della collisione" è che sono altamente dipendenti dalla concentrazione.

Da quanto detto, sembrerebbe che questi sistemi computerizzati attualmente disponibili non siano in grado di fornire misurazioni accurate sulla concentrazione degli spermatozoi e sulla loro motilità. In realtà, vi sono importanti applicazioni che derivano dai sistemi SCA nell'analisi del movimento degli spermatozoi, che si sta rivelando un ulteriore ed importante parametro per la determinazione del potenziale di funzionalità nemaspermica.

Microscopio Confocale a Scansione Laser (CSLM)

Il microscopio confocale è un microscopio a fluorescenza che permette di scandire i segnali di fluorescenza emessi da varie sezioni del campione parallele al piano, in base ai differenti piani di fuoco stabiliti dall'operatore. A tal proposito é necessario che il campione sia opportunamente marcato con markers molecolari fluorescenti che prendono il nome di fluorocromi.

La microscopia confocale si basa, quindi, su una tecnologia volta ad accrescere sensibilmente la risoluzione spaziale del campione, eliminando gli aloni dovuti alla luce diffusa dai piani fuori fuoco del preparato. Le basi teoriche dello strumento, in senso lato, vennero poste verso la metà degli anni cinquanta dallo scienziato Marvin Lee Minsky

I primi apparati progettati, effettivamente costruiti e diffusi in campo applicativo, furono microscopi con tecnologia CLSM (confocal laser scanning microscopy), costruiti nel Regno Unito all'inizio degli anni '90 ed inizialmente commercializzati dalla ditta Bio-Rad, sulla base di ricerche condotte al *MRC Laboratory of Molecular Biology* di Cambridge da William Bradshaw Amos negli anni '80 (White 1987).

La sorgente luminosa è costituita da uno o più laser, generalmente a semiconduttore, per ogni diversa frequenza di eccitazione richiesta:

- Argon a due lunghezze d'onda (458 o 488 nm) per eccitare ad es. FITC;
- Elio-Neon (543 nm) per eccitare ad es. la Rodamina;
- Elio-Neon (633 nm) per eccitare ad es. Cy5;

Il meccanismo di direzione del fascio luminoso viene gestito da sistemi computerizzati. Le immagini ottenute, sincronizzando col fascio di eccitazione il

dispositivo di rivelazione, sono particolarmente definite e permettono di evidenziare con differenti colori le diverse molecole presenti nel preparato, permettendo di apprezzarne la tridimensionalità.

Nei moderni microscopi confocali la luce laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato. Il punto stesso, attraverso un sistema di specchi oscillanti, viene spostato attraverso l'intero campo visivo così da effettuare una scansione completa di tutto il piano focale.

Le caratteristiche della luce laser (estrema coerenza, alta intensità e lunghezza d'onda unica) consentono di evitare fenomeni di aberrazioni e diffrazioni tipiche invece della luce prodotta da tradizionali lampade a incandescenza. Inoltre, le lenti dell'obiettivo fanno sì che l'intensità della luce laser sia sufficiente a eccitare i fluorocromi soltanto nel punto di massima concentrazione del raggio, corrispondente al piano di fuoco dell'obiettivo. In questo modo, le aree superiori ed inferiori al piano di fuoco, non venendo eccitate, non contribuiscono alla formazione dell'immagine, limitando la formazione di aloni e riducendo il "rumore di fondo". La luce emessa dai fluorocromi, presenti nel campione, viene catturata dalle lenti dell'obiettivo e deviata da uno specchio dicroico (linea nera diagonale) su un fotomoltiplicatore, che trasforma l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettrico d'intensità proporzionale. Tra lo specchio dicroico e il fotomoltiplicatore è inserito un diaframma o pinhole, attraverso il quale passa il fascio luminoso, che impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco di raggiungere il fotomoltiplicatore. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano di fuoco viene registrato e utilizzato nella formazione dell'immagine finale (Fig.11).

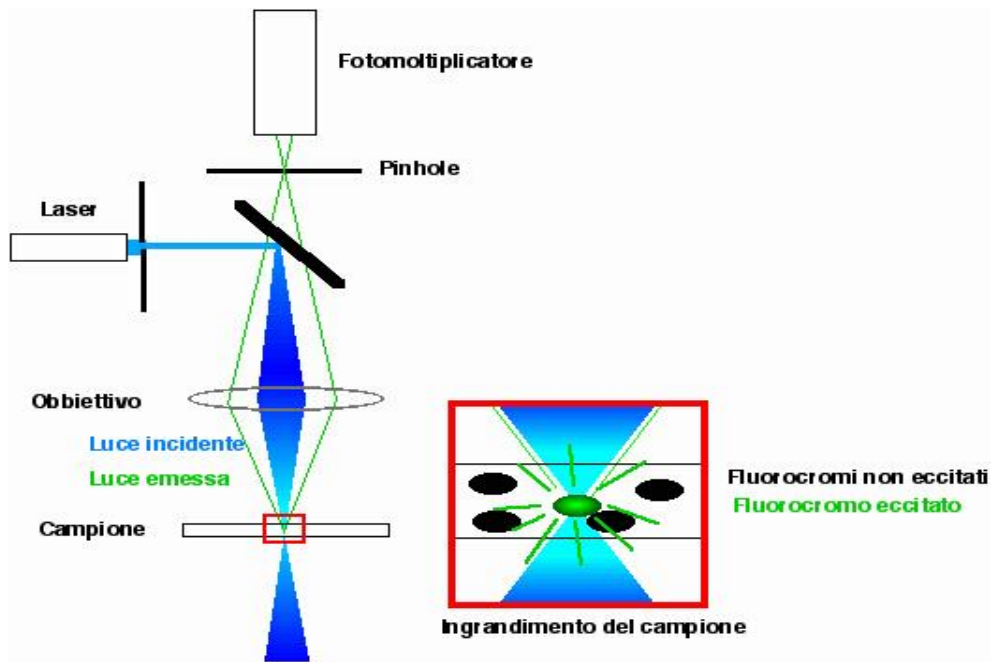


Figura 11: Rappresentazione del sistema di lenti del microscopio confocale

Il segnale elettrico in uscita dal fotomoltiplicatore è quindi digitalizzato e inviato ad un computer che ne registra l'intensità per ogni punto. I valori ottenuti vengono poi utilizzati per ricostruire l'immagine: ogni punto del campione verrà cioè a corrispondere ad un pixel dello schermo, e l'intensità luminosa del punto verrà rappresentata da una corrispondente tonalità di grigio. L'accostamento di tutti i singoli pixel darà l'immagine finale.

Spostando lungo l'asse verticale il campione dopo ogni scansione, è possibile eseguire serie di scansioni corrispondenti a piani focali sempre più profondi all'interno del campione. Queste scansioni prendono il nome di sezioni ottiche e dalla loro sovrapposizione ordinata, eseguita via software, è possibile ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scandito, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco (Fig.12).

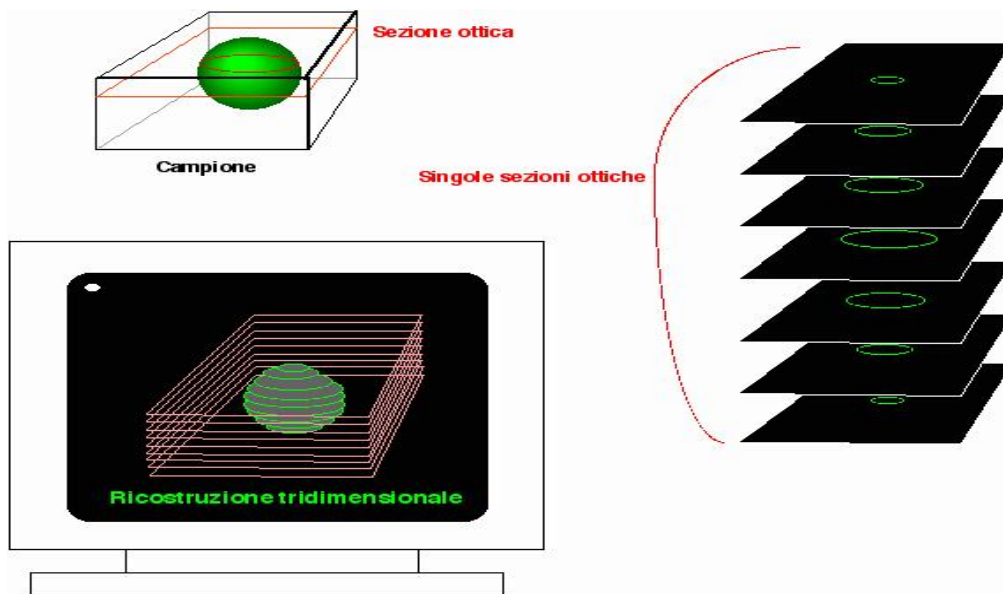


Figura 12: Scansioni di più piani focali

Utilizzando software specifici è possibile, infine, eseguire elaborazioni dell'immagine (regolazione del contrasto, ombreggiatura, cromia, ecc.), costruzioni tridimensionali e misurazioni dei campioni mediante il controllo della dimensione delle sezioni ottiche ottenute.

Nell'ambito della ricerca tale strumento si dimostra molto efficace, in quanto permette di visualizzare strutture che non sono distribuite in modo omogeneo nel citoplasma cellulare. I campioni devono sempre essere marcati con probes fluorescenti specifici per ogni componente cellulare, dopo una fissazione che immobilizza la situazione citoplasmatica in un determinato momento d'interesse.

In particolare i campioni da osservare sono stati marcati con Hoechst 33342 10µg/ml. È stato utilizzato per l'osservazione il microscopio confocale Leica TS SP5

e un obiettivo 63X ad immersione in olio. La sorgente luminosa in questo caso è stata un laser ad argon alla lunghezza d'onda di 405 e 488 nm.

Effetti della temperatura su spermatozoi umani

I campioni di liquido seminale fresco sono stati raccolti, previo consenso informato, da 10 pazienti (dai 23-30 anni di età) di cui sette normospermici, due oligospermici ed uno astenospermico. Prima di tutto è stata effettuata l'analisi del liquido seminale secondo i criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS 2010) e poi si è proceduto con il trattamento. Il seme è stato suddiviso in aliquote e sono stati preparati i campioni come indicato di seguito. In tutti gli esperimenti, una porzione del campione è stata tenuta come controllo e altre due aliquote incubate per 1h a due diverse temperature: temperatura ambiente (RT) e 37° C. I campioni, dunque, erano:

- Controllo
- 1h RT
- 1h 37°C

Effetti della temperatura sulla cinetica

Dei diversi campioni è stata analizzata la cinetica in termini di motilità totale, progressiva e i parametri cinetici quali VCL, VSL, VAP dopo 1 ora di incubazione alle suddette temperature. L'analisi è stata effettuata mediante l'utilizzo del sistema computerizzato SCA.

Effetti della temperatura sulla vitalità

Gli esperimenti, rivolti a studiare l'influenza della temperatura sulla vitalità degli spermatozoi, sono stati eseguiti utilizzando la sonda Live/Dead Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit (Invitrogen). Questo metodo si basa sulla reazione di un colorante fluorescente reattivo con ammine cellulari. Il colorante reattivo può

permeare le membrane compromesse di cellule necrotiche, e reagire con le ammine libere sia all'interno che sulla superficie cellulare, determinando un'intensa colorazione fluorescente. Al contrario, quando solo le ammine di superficie di cellule vitali sono disponibili per reagire con il colorante, esse presenteranno una colorazione relativamente tenue. La differenza di intensità, tra la popolazione di cellule vive e la rispettiva di cellule morte, è di circa 50 volte. I campioni, quindi, sono stati lavati in Gamete Buffer a 1600 rpm per 10 minuti, risospesi in tampone fosfato salino di Dulbecco (DPBS) e poi incubati con il colorante reattivo fluorescente per 30 minuti, in ghiaccio e al riparo dalla luce. Una volta trattati per saggiare la vitalità con la sonda live/dead, tali campioni sono stati rilavati in DPBS a 1600 rpm per 10 minuti, e risospesi in mezzo fresco, per poi essere processati per il test di frammentazione genomica, come verrà descritto in seguito.

Effetti della temperatura sulla frammentazione del DNA

Esperimenti, indirizzati a studiare l'effetto della temperatura sulla frammentazione del DNA di spermatozoi umani, sono stati realizzati mediante saggio TUNEL Assay. Il saggio TUNEL (Terminal Transferase UTP Nick End Labeling) viene utilizzato per rilevare la frammentazione del DNA in cellule apoptotiche. Questo processo consiste nella frammentazione della cromatina nucleare che genera estremità di DNA con gruppi 3'-OH liberi. La miscela di reazione TUNEL (Roche, Germany: in situ cell death detection) è costituita da: un enzima, la TdT (Terminal deoxy nucleotidyl transferase), che catalizza la reazione di polimerizzazione di nucleotidi marcati con fluoresceina isotiocianato (FITC) all'estremità libere 3'OH delle molecole di DNA frammentate, e da nucleotidi marcati che riempiono le interruzioni a livello del DNA ed emettono una tipica fluorescenza verde, tanto più intensa quanto più sono estese le

rotture sul DNA. La Tunel Assay è stata preceduta dal trattamento con ditionitrotolo (DTT), un agente decondensante che rilassa la struttura cromatinica degli spermatozoi rompendo i ponti di-solfuro delle protammine adiacenti, permettendo così la decondensazione della cromatina e consentendo, quindi, una maggiore apertura della doppia elica del DNA ed un'elevata efficacia di penetrazione della miscela Tunel.

I campioni: controllo, 1h RT e 1h 37°C, trattati precedentemente con la sonda live/dead, sono stati poi incubati con DTT 2mM per 45 minuti a temperatura ambiente e in seguito processati per la Tunel Assay. Tale metodica consta di diversi passaggi:

Fissazione: i campioni sono stati lavati in tampone fosfato salino (PBS1x) a 1600 rpm per 10 minuti, una volta eliminato il surnatante, sono stati fissati in sospensione in paraformaldeide al 4% per 30 minuti a RT. La paraformaldeide è un poliossimetilene oligomero della formaldeide, ha un elevato potere di penetrazione, agisce formando legami crociati con gli amminoacidi delle proteine ed è inoltre in grado di preservare la morfologia delle cellule e la reattività delle macromolecole.

Al termine della fissazione i campioni sono stati lavati in PBS 1x mediante centrifugazione a 1600 rpm per 10 minuti; in seguito sono stati risospesi in PBS 1x e "spottati" sui vetrini.

Permeabilizzazione: su ogni spot è stata aggiunta la soluzione permeabilizzante (0.1 % Triton X-100 in 0.1 % di sodio citrato) ed è stata lasciata agire per 5 minuti a 4°C. Il Triton X-100 (Sigma) è un tensioattivo non ionico utilizzato generalmente per solubilizzare le proteine di membrana nel loro stato nativo, ed è inoltre impiegato per permeabilizzare le membrane della cellula eucariotica. Al termine del processo di

permeabilizzazione, l'eccesso di detergente è stato allontanato dai vetrini mediante lavaggi.

Tunel assay: ai campioni è stata aggiunta la miscela TUNEL ed incubati in una camera umida, al buio, per 1 ora a 37°C.

Marcatura con Hoechst 33342: i campioni sono stati marcati con Hoechst 33342 (Sigma) 10 µg/ml, per 7 minuti a RT. La colorazione con Hoechst 33342 consente di marcare tutta la popolazione spermatica; si tratta di un colorante specifico per le regioni ricche in A-T del DNA, presenta un picco di eccitazione a 340 nm e un picco di emissione a 510 nm; è in grado di colorare sia cellule vitali che non vitali in tal modo, quindi, l'intera popolazione cellulare appare marcata di blu.

Osservazione al Microscopio Confocale

Una volta effettuati tali saggi, per l'analisi della vitalità spermatica e della frammentazione genomica, i campioni sono stati osservati al microscopio confocale Leica TCS SP5 (Leica, Milano, Italia). La colorazione con Hoechst è stata rilevata a 416-625 nm; la fluoresceina, che indicava la frammentazione genomica spermatica, è stata rilevata a 498-640 nm; mentre il far red, che indicava la popolazione di spermatozoi non vitali è stato rilevato a 643-800 nm.

Un'analisi statistica significativa, per il calcolo della percentuale di DNA danneggiato e della vitalità spermatica, richiede l'osservazione di almeno 200 cellule per ciascun campione.

Effetti della temperatura su spermatozoi umani dopo procedure di swim up

I campioni di liquido seminale fresco sono stati raccolti, previo consenso informato, da 5 pazienti (27-35 anni di età), tutti normospermici.

Per prima cosa è stato effettuato lo spermogramma, come precedentemente descritto, secondo i criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (2010).

In questo tipo di esperimento si è indagato l'effetto della temperatura a seguito di una procedura di selezione spermatica, quale lo swim up. Questa metodica viene eseguita stratificando sul liquido seminale un piccolo volume di terreno di coltura (gamete buffer) ed incubando il seme così preparato a 37° per 45 minuti, in una conica a fondo tondo inclinata di 45°; questo permette agli spermatozoi con una migliore motilità di migrare verso l'alto così da poter essere facilmente recuperati e separati da quelli dotati di scarsa motilità o, addirittura, immotili.

Recuperati gli spermatozoi, così selezionati, sono stati preparati i campioni, dividendo il recuperato in tre differenti aliquote: la prima rappresentava il campione controllo, la seconda il campione incubato 3h a RT dopo swim up e l'ultima il campione incubato 3h a 37° C dopo swim up. I campioni dunque erano:

- Controllo
- 3h RT post swim up
- 3h 37°C post swim up

Effetti della temperatura sulla cinetica, sulla vitalità e sulla frammentazione genomica dopo procedure di swim up

Ogni ora è stata valutata la motilità totale e progressiva ed i parametri cinetici mediante il sistema computerizzato SCA, dopo di che tutti i campioni sono stati trattati come precedentemente descritto, sia per quanto riguarda la vitalità che per la frammentazione genomica.

Effetti della concentrazione su spermatozoi umani

Sono stati analizzati, in accordo con i criteri World Health Organization e previo consenso informato, campioni di seme di 7 pazienti di età compresa tra i 25 ed i 35 anni al fine di valutarne concentrazione, motilità e morfologia. Tutti i pazienti inclusi nello studio erano normospermici. Al termine di queste valutazioni i campioni sono stati lavati e poi ri-sospesi in un opportuno mezzo di coltura, dopo di che sono stati divisi in aliquote e preparati attraverso delle diluizioni seriali in mezzo di coltura rispettando degli intervalli prefissati di concentrazione cellulare (range). I campioni dunque erano:

- Range 1 = 100 mln – 70 mln
- Range 2 = 50 mln – 35 mln
- Range 3 = 25 mln – 15 mln
- Range 4 = 10 mln – 5 mln

A questo punto i campioni sono stati incubati per 3 ore a 37° C.

Effetti della concentrazione sulla cinetica, sulla vitalità e sulla frammentazione genomica

Ogni ora è stata valutata la motilità totale e progressiva ed i parametri cinetici mediante il sistema computerizzato SCA, dopo di che tutti i campioni sono stati trattati come precedentemente descritto, sia per quanto riguarda la vitalità che per la frammentazione genomica.

Effetti del pretrattamento con antiossidanti e, successiva, induzione dello stress ossidativo esogeno su spermatozoi nel modello bovino

Il seme utilizzato, proveniva da tori donatori, di provata fertilità, acquistato presso l'INSEME ITALY (S. Giuliano Saliceta, Modena), conservato all'interno di paillettes e congelato in azoto liquido in sottili tubi di cloruro di polivinile, che offrono un vantaggioso rapporto superficie-volume, consentendo un rapido ed omogeneo congelamento. Sono state scongelate tre paillettes di seme bovino appartenente a 3 tori diversi, al fine di avere una maggiore eterogeneità del campione. È stato eseguito un tipo di scongelamento rapido, che consiste nel passaggio diretto dall'azoto liquido all'acqua calda, alla temperatura di 38.8°C. Questo tipo di tecnica serve ad evitare che vi siano danni alle strutture cellulari. In seguito alla verifica, mediante osservazione al microscopio ottico, che gli spermatozoi non avessero subito alterazioni della motilità in seguito allo scongelamento, il contenuto di ciascuna paillette è stato raccolto in una provetta a fondo conico da 15 mL e centrifugato a 1100 rpm per 10 minuti in opportuno mezzo di lavaggio (SpermTalp BSA-free). Dopo la rimozione del surnatante, il pellet ottenuto è stato risospeso in 1 ml di mezzo di Fecondazione e sono state valutate la concentrazione spermatica, tramite conta degli spermatozoi con la camera di Bürker e la motilità mediante l'ausilio del sistema computerizzato SCA e della camera di Makler come precedentemente descritto per il seme umano.

Antiossidanti

Sono stati utilizzati antiossidanti di tipo non enzimatico contenuti nell'integratore alimentare Genadis (Merk Serono): le differenti concentrazioni utilizzate sono state

ottenute confrontando dati bibliografici e dati ottenuti da prove effettuate in precedenza nello stesso laboratorio presso il quale ho svolto la mia attività di dottorato:

- *Coenzima Q10*: il coenzima Q10 ha un peso molecolare di 863,34 g/L. Secondo indicazione del prodotto si preparava uno stock iniziale di CoQ10 concentrato 58 mM sciogliendo 50 mg di prodotto stesso in 1 ml di Cloroformio (Carlo Erba).

È stata adoperata la concentrazione finale di CoQ10: 50 μM

- *Acido D-aspartico*: si preparava uno stock iniziale concentrato 15 mM ottenuto sciogliendo 0,0020 g di D-asp in 1 ml di mezzo di fecondazione.

È stata adoperata la concentrazione finale di D-asp: 3,76 mM.

- *Zinco*: si preparava uno stock concentrato 0,160 M, ottenuto con 28 μL di ZnCl₂ in 1 ml di H₂O milliQ.

È stata adoperata la concentrazione finale di zinco: 80 μM.

Agente ossidante

Le concentrazioni di Xantina-Xantina Ossidasi (X-XO) utilizzate sono state scelte confrontando lavori presenti in letteratura, con i risultati di prove effettuate, in precedenza, in laboratorio.

- *Xantina (X)*: la X ha un peso molecolare di 152,11 g/L. Si preparava uno stock di X concentrato 100 mM, ottenuto sciogliendo 50 mg di prodotto stesso, in 1 ml di NaOH 1M.

È stata adoperata la concentrazione finale di X: 0,1 mM.

- *Xantina Ossidasi (XO)*: abbiamo una concentrazione iniziale di 11,76 U/ml. Per ottenere la concentrazione finale di 0.01 mM preleviamo 0,85 µl di XO che aggiungiamo ai campioni.

Preparazione dei campioni

I campioni di liquido seminale erano:

- controllo
- x-xo: trattato con 0,1 mM xantina - 0,01U/ml xantina ossidasi;
- genadis: pre-trattato con zinco, CoQ10 e D-Asp e successivamente trattato con 0,1 mM xantina - 0,01U/ml xantina ossidasi.

Gli spermatozoi bovini sono stati pretrattati con antiossidanti per 1h e poi trattati con X-XO per 2h. Tutti i campioni sono stati incubati a 38°C in presenza del 5 % di CO₂. In tutti gli esperimenti, ai campioni controllo e x-xo, sono state aggiunte le stesse concentrazioni dei veicoli di zinco, D-Asp, e CoQ10 dei campioni trattati.

Effetto del pretrattamento con antiossidanti e, successiva, induzione dello stress ossidativo esogeno sulla cinetica e sulla frammentazione genomica

In seguito alla preparazione dei campioni, ogni ora è stata valutata la cinetica in termini di motilità totale, progressiva e i parametri cinetici quali VCL, VSL, VAP mediante l'utilizzo del sistema computerizzato SCA. Dopo di che tutti i campioni sono stati trattati come precedentemente descritto per il seme umano per l'analisi della frammentazione genomica mediante Tunel Assay.

Effetti sulla qualità degli embrioni ottenuti da fecondazione con spermatozoi pretrattati con antiossidanti e sottoposti, successivamente, a stress ossidativo esogeno nel modello bovino

Gli spermatozoi precedentemente descritti (pretrattati con antiossidanti e a cui è stato indotto, poi, uno stress ossidativo esogeno) sono stati utilizzati per fecondare ovociti bovini al fine di valutare i loro effetti in termini di sviluppo embrionale e frammentazione genomica della blastocisti.

Fecondazione dei gameti bovini

Per prima cosa si è proceduto con il recupero delle ovaie al momento della macellazione degli animali, presso il macello Straccione di San Marcellino ed il macello Abagnale di S. Antonio Abate. Il trasporto in laboratorio è stato effettuato in contenitori sterili a secco a 30°C. Una volta in laboratorio, si è proceduto all'aspirazione del fluido follicolare dalle ovaie eseguita con un aspiratore automatico; i follicoli recuperati sono stati lasciati sedimentare per circa 10 minuti in coniche da 15 ml in incubatore a 38.8°C in presenza del 5% CO₂.

Il sedimento ottenuto è stato distribuito in capsule Petri da 10 cm, grigliate e preriscaldate per eseguire lo screening dei complessi cumulo ooforo-ovocita (COC) allo stereomicroscopio su piastra riscaldata. I COCs recuperati sono stati lavati tre volte in mezzo di lavaggio per eliminare il fluido follicolare e trasferiti in pozzetti multi-well contenenti 500 µl di mezzo di maturazione ed incubati, così, a 38.8°C, 5% CO₂ per 22-24h. Trascorso questo tempo di maturazione, i COCs hanno subito altri tre lavaggi e poi sono stati trasferiti in gruppi di 50 in pozzetti multi-well contenenti 250 µl di mezzo di fecondazione ed incubati a 38.8°C, 5% CO₂. A questo punto i COCs sono stati inseminati con le tre sospensioni spermatiche prima descritte; sono

stati aggiunti 250 µl di rispettiva sospensione spermatica al pozzetto contenente i COCs in 250µl di mezzo di fecondazione, con l'aggiunta di eparina 100 µg/ml che funge da capacitante, così da ottenere una concentrazione spermatica finale di 2×10^6 di spermatozoi motili/ml. I COCs così inseminati sono stati incubati a 38.8°C ,5% CO₂, e 95% umidità per 22-24 ore.

Passate le 22-24 ore dalla fecondazione si è proceduto alla rimozione meccanica delle cellule del cumulo ooforo dagli zigoti. Gli zigoti sono stati trasferiti in coniche da 15 ml contenenti 1 ml di mezzo di lavaggio e vortexati per 2 minuti; dopo di che si è verificata l'avvenuta denudazione tramite osservazione al microscopio. In caso in cui questa non si verificasse si utilizza un metodo alternativo che si basa sull'uso di una particolare pipetta, la Flexi-Pet, con puntali ad ago con un diametro di 130 µm; gli zigoti circondati da resti di cellule del cumulo vengono aspirati e rilasciati ripetutamente in modo da provocarne il distacco. Alla rimozione delle cellule del cumulo sono seguiti tre lavaggi in mezzo di lavaggio e un lavaggio nel mezzo di coltura embrionale, gli zigoti sono stati poi incubati in pozzetti multi-well contenenti 700 µl di mezzo di coltura embrionale ad atmosfera modificata a 38.8°C, 5% CO₂, 5% O₂ e restante parte di azoto.

Effetto sullo sviluppo embrionale

Dopo 72 ore dall'inseminazione, gli embrioni sono stati osservati al microscopio invertito Nikon Eclipse TE2000-U in modulazione di contrasto per valutare le percentuali di fecondazione e le percentuali di embrioni a 8 cellule, al fine di rilevare possibili differenze tra i campioni trattato e controllo. Le percentuali di fecondazione sono espresse come numero di ovociti fecondati/numero di ovociti totali. Le

percentuali di embrioni a 8 cellule sono espresse come numero di embrioni a 8 cellule/numero di ovociti fecondati.

Effetto sulla frammentazione del DNA della blastocisti

Esperimenti, indirizzati a valutare la percentuale di blastomeri con DNA frammentato in blastocisti ottenute da fecondazioni con le tre differenti sospensioni spermatiche, ovvero con spermatozoi controllo, spermatozoi pretrattati con antiossidanti e a cui è stato indotto uno stress esogeno o con spermatozoi trattati solo con l'agente ossidante,

sono stati realizzati mediante saggio Tunel Assay. Il saggio Tunel consta di diversi passaggi:

Fissazione: gli embrioni sono fissati in paraformaldeide al 4% con FCS 1% per 4 h a temperatura ambiente. Al termine della fissazione sono stati eseguiti lavaggi in PBS 1x per 10 minuti a temperatura ambiente.

Permeabilizzazione: agli embrioni è stata aggiunta la soluzione di permeabilizzazione, Triton x-100 allo 0,1 % in sodio citrato 0,1 %, per 30 min a 4°C al buio, dopo di che sono stati effettuati 3 lavaggi da 10 min in PBS-PVA (poly-vinyl alcool).

Tunel: gli embrioni sono stati incubati in gocce da 50 µl di miscela TUNEL 1:10 (5 µl di soluzione enzimatica TdT 45 µl di miscela di nucleotidi), in cameretta umida a 37°C per 1 ora. Dopo di che sono stati fatti 3 lavaggi da 10 minuti in PBS-PVA.

Marcatura con Hoechst: gli embrioni sono stati trasferiti in gocce da 50 µl di Hoechst 33342 1 µg/ml in PBS /PVA per 7 minuti a temperatura ambiente. Dopo i successivi 3 lavaggi in PBS/PVA per 10 minuti, si è proceduto all'osservazione degli

embrioni al microscopio ad epifluorescenza (Nikon Eclipse TE2000-U) collegato ad una videocamera Nikon DS-5Mc.

Effetto dell'inibizione della via di segnalazione PI3K/PTEN/Akt contro i danni indotti da chemioterapici, sulla salute follicolare nel modello murino

Si è valutato, nel topo, se l'inibizione della via di segnalazione PI3K / PTEN / Akt, attraverso l'utilizzo di un inibitore specifico della chinasi Akt a diverse concentrazioni, possa proteggere la riserva ovarica dai danni del cisplatino. Nello specifico si è valutato l'effetto del pretrattamento per un'ora con l'inibitore di Akt seguito dal trattamento per 24h con cisplatino su frammenti di ovaio di topi al 4°giorno dopo la nascita, in termini di salute follicolare.

Chemioterapico cisplatino

Si preparava uno stock, diluito in acqua, alla concentrazione di 3.3 mM; la concentrazione utilizzata era 10uM. La concentrazione utilizzata è stata scelta sulla base di esperimenti già effettuati presso il laboratorio in cui ho svolto la mia esperienza all'estero.

Inibitore della serina/treonina chinasi Akt

Si preparava uno stock iniziale, diluito in mezzo di coltura, alla concentrazione di 3.3 mM; le concentrazioni testate erano:

-1 μ M

-0.1 μ M

-0.01 μ M

-0.001 μ M

Le concentrazioni utilizzate sono state scelte sulla base di esperimenti già effettuati presso il laboratorio in cui ho svolto la mia esperienza all'estero.

Coltura dei frammenti ovarici

Ovaie di femmine di topo CD1 al 4-5 giorno dopo la nascita sono state frammentate in otto pezzi ciascuna con l'utilizzo di un ago da 25G in opportuno mezzo di dissezione. Dopo di che i frammenti sono stati distribuiti in una piastra da 24 wells e coltivati per sei giorni in mezzo di coltura. Dopo 48h di coltura si poteva osservare la formazione del monolayer e si procedeva con il cambio della metà del volume di mezzo di coltura. Al sesto giorno di coltura, poi, i frammenti di ovaio venivano trattati con l'inibitore di Akt per 1h e successivamente trattati con cisplatino per 24h.

Colorazione con Trypan blue

Dopo le 24h di trattamento con cisplatino, veniva aggiunto ai pozzetti Trypan blue e lasciati, così, a 37° per 5 minuti. Dopo opportuni lavaggi si procedeva all'osservazione allo stereomicroscopio. Il Trypan Blue è un colorante che colora le cellule morte, per cui ci permette di poter contare, in un follicolo, la quantità di cellule della granulosa apoptotiche/necrotiche e di distinguere, anche un ovocita vivo da uno morto.

Conta cellulare

Dopo aver collezionato le foto di tutti i frammenti di ovaio coltivati e colorati con Trypan Blue, queste venivano analizzate per procedere alla conta delle cellule morti in ogni singolo follicolo. Un follicolo veniva considerato atresico quando presentava non vitale l'ovocita o più del 50% di cellule della granulosa.

Analisi statistica dei dati

I dati dei vari esperimenti sono presentati come deviazioni standard (SD) delle medie. Nel complesso, l'analisi è stata effettuata mediante il test esatto di *Fisher* o

tramite il modello di stima *ANOVA*, seguito dal *Tukey's range test*. I dati ottenuti sono stati presentati come percentuali cumulative.

RISULTATI PARTE SCIENTIFICA

Effetto della temperatura su spermatozoi umani

Effetto della temperatura sulla cinetica spermatica

I campioni incubati per 1h a due diverse temperature: temperatura ambiente (RT) e 37° C sono stati analizzati per la valutazione della motilità totale, progressiva e dei parametri cinetici. Sia per quanto riguarda la motilità totale e progressiva, che per quanto riguarda i parametri cinetici, i dati non hanno mostrato differenze significative tra i campioni analizzati (fig.13a e 13b).

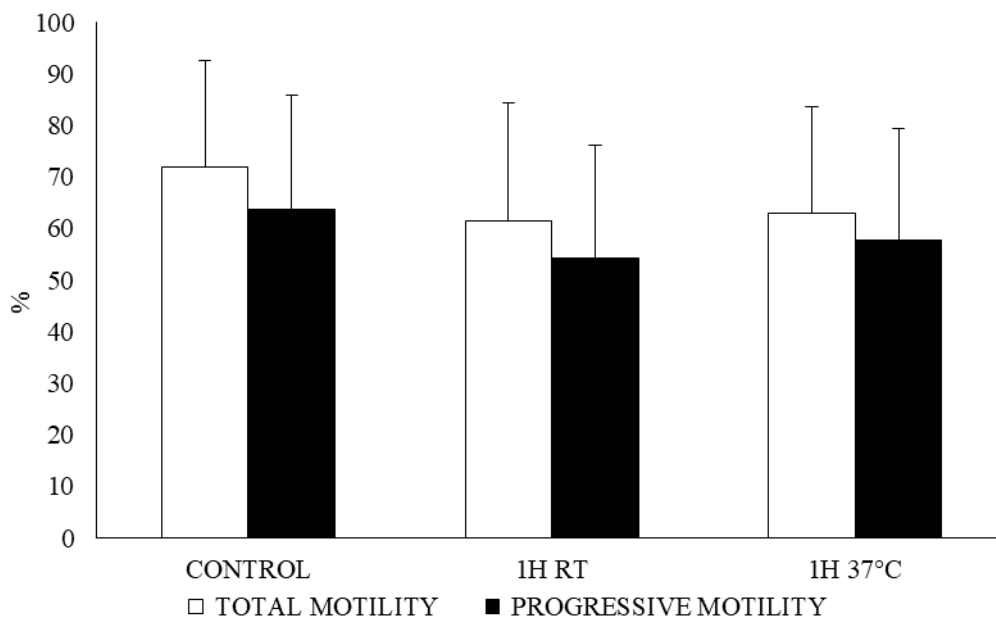


Figura 13a: Effetto della temperatura sulla motilità totale e progressiva

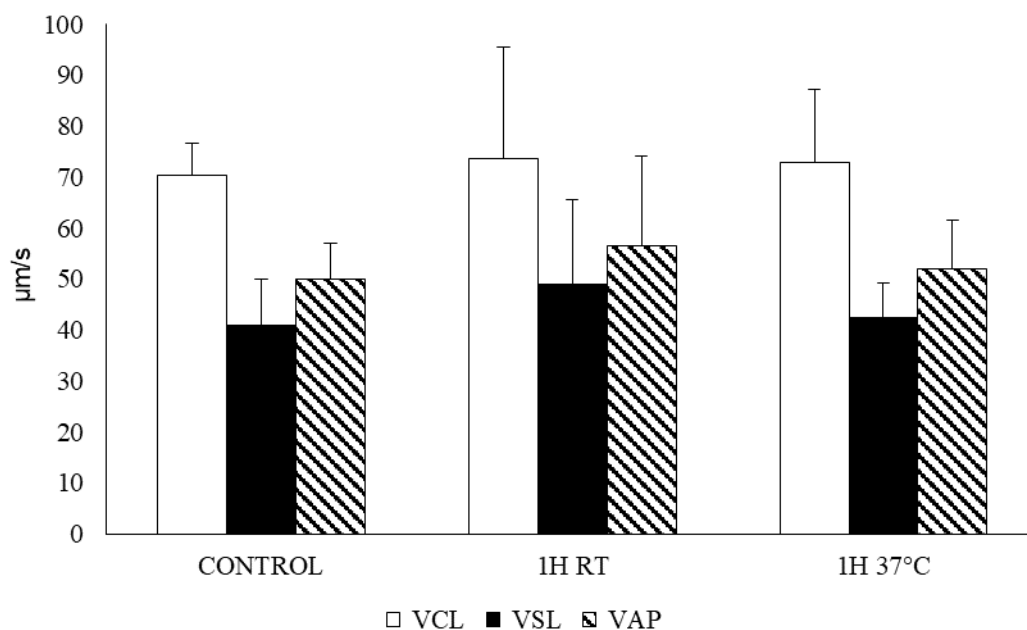
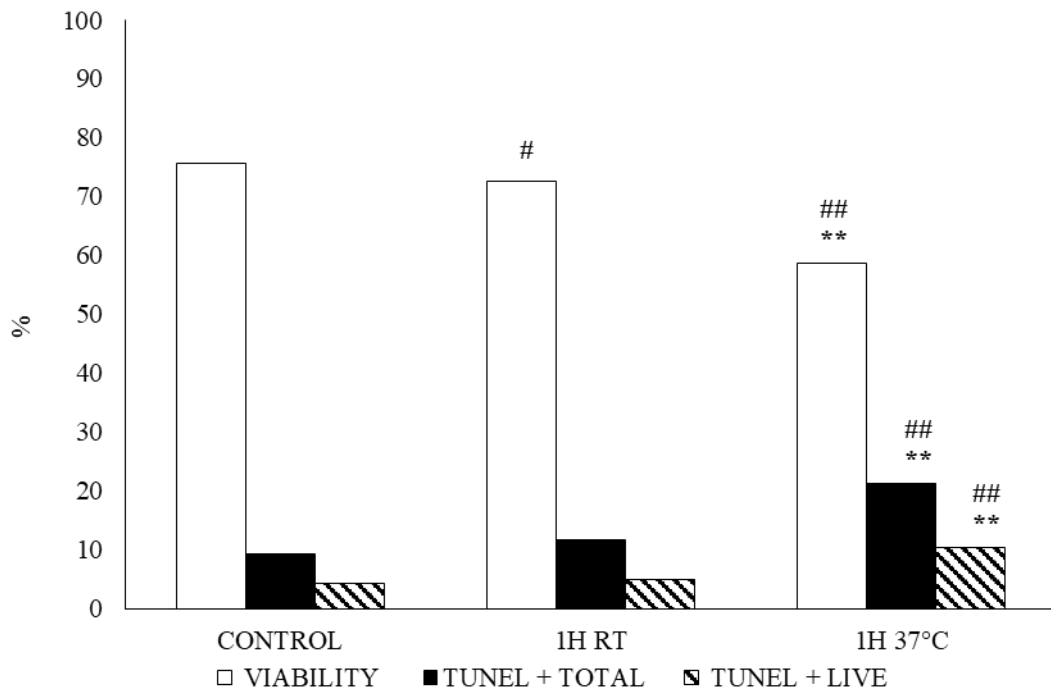


Figura 13b: Effetto della temperatura sui parametri cinetici

Effetto della temperatura su vitalità e frammentazione del DNA

L'effetto della temperatura è stato analizzato non solo sulla cinetica spermatica ma anche sulla vitalità e sull'integrità genomica. Per quanto concerne la vitalità, dopo 1h di incubazione alle differenti temperature i risultati hanno mostrato una differenza significativa tra il campione 1h RT e il campione controllo (CONTROL 75.75 % vs 1h RT 72,7 %) ed una differenza estremamente significativa tra campione 1h 37°C confrontato sia con il controllo sia con 1h RT (CONTROLLO 75.75 %; 1h RT 72,7 %; 1h 37° C 58,6 %). Per quanto riguarda lo studio della frammentazione genomica, invece, i dati non hanno mostrato differenze significative tra controllo e 1h RT (CONTROL 9,4% vs 1h RT 11,7 %), mentre tale differenza è risultata estremamente significativa quando si è confrontato il campione 1h 37° C sia con controllo sia con 1h RT (CONTROL 9,4%; 1h RT 11,7 %; 1h 37° C 21,3 %). Inoltre, i dati hanno

mostrato che non vi è differenza nella percentuale di spermatozoi vivi che presentano un danno al DNA tra campione controllo e 1h RT, ma tale differenza diventa estremamente significativa quando si confronta 1h 37°C sia con 1h RT che con il campione controllo (CONTROL 4.38%; 1H RT 5%; 1H 37°C 10.35%) (fig.14-15).



*Figura 14: Effetto della temperatura sulla vitalità spermatica e sull'integrità genomica. #: differenza significativa rispetto al controllo ($p < 0,05$); ##: differenza altamente significativa rispetto al controllo ($p < 0,01$); **: differenza altamente significativa rispetto al campione di confronto ($p < 0,01$).*

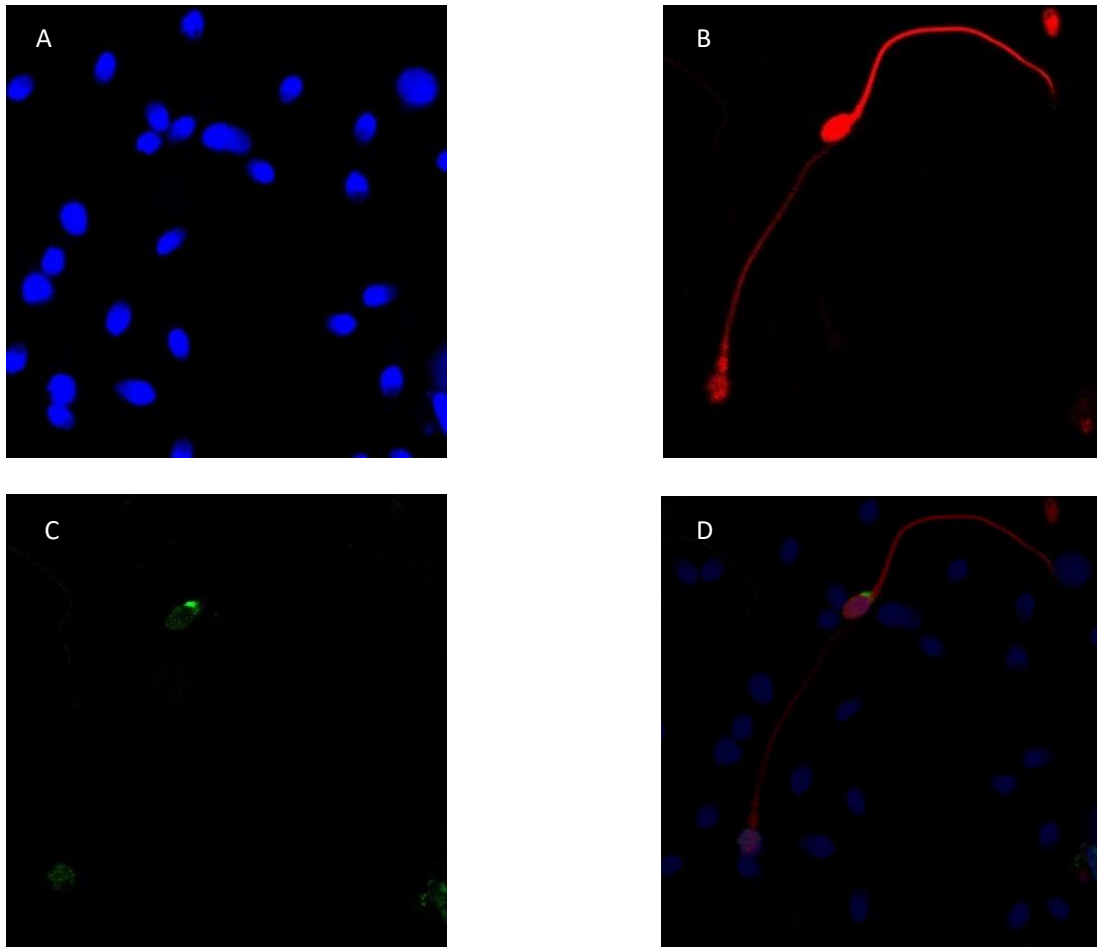


Figura 15: (A) Spermatozoi marcati con Hoechst 33342. (B) Spermatozoi marcati con Live/Dead Fixable Far Red Stain Cell Kit. (C) Spermatozoi marcati con Tunel Assay. (D) Sovrapposizione delle immagini A B e C.

Effetto della temperatura su spermatozoi umani dopo la procedura di swim up

Effetto della temperatura sulla cinetica spermatica dopo la procedura di swim up

I campioni sono stati incubati per 3 ore a due diverse temperature: temperatura ambiente (RT) e 37° C, dopo aver eseguito il processo di selezione spermatica swim up. Tali campioni sono stati, poi, analizzati al fine di esaminare la motilità totale,

progressiva e i parametri cinetici. Come per il precedente esperimento, anche in questo caso, i dati non hanno mostrato differenze significative tra i campioni analizzati sia per quanto riguarda la motilità totale e progressiva, che per quanto riguarda i parametri cinetici (fig.16a e 16b).

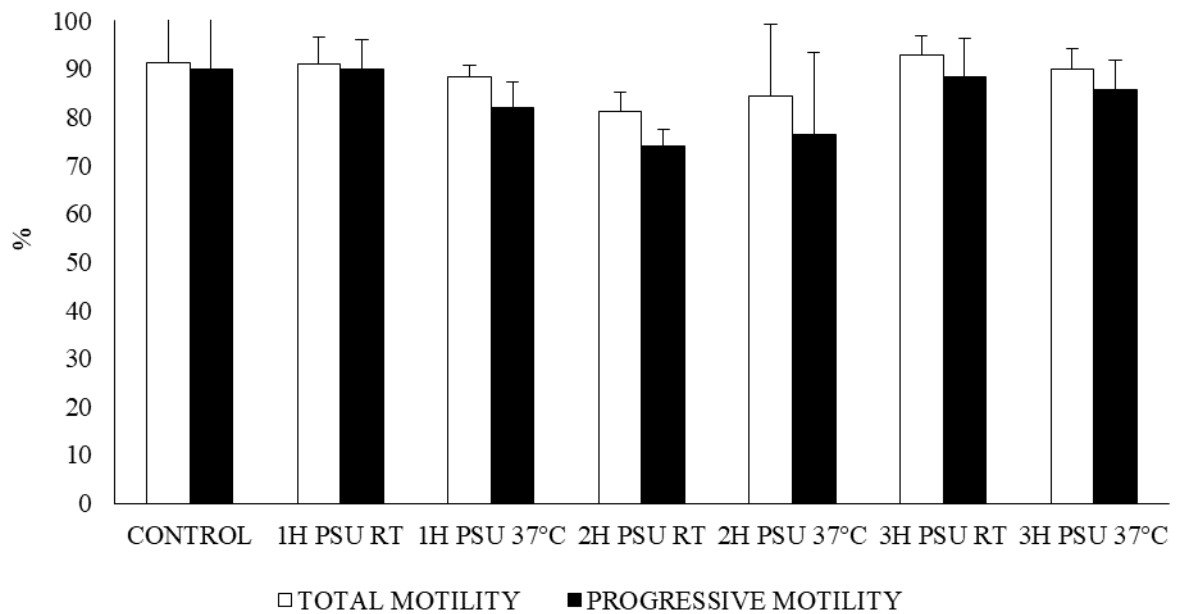


Figura 16a: Effetto della temperatura sulla motilità totale e progressiva in spermatozoi selezionati con swim up

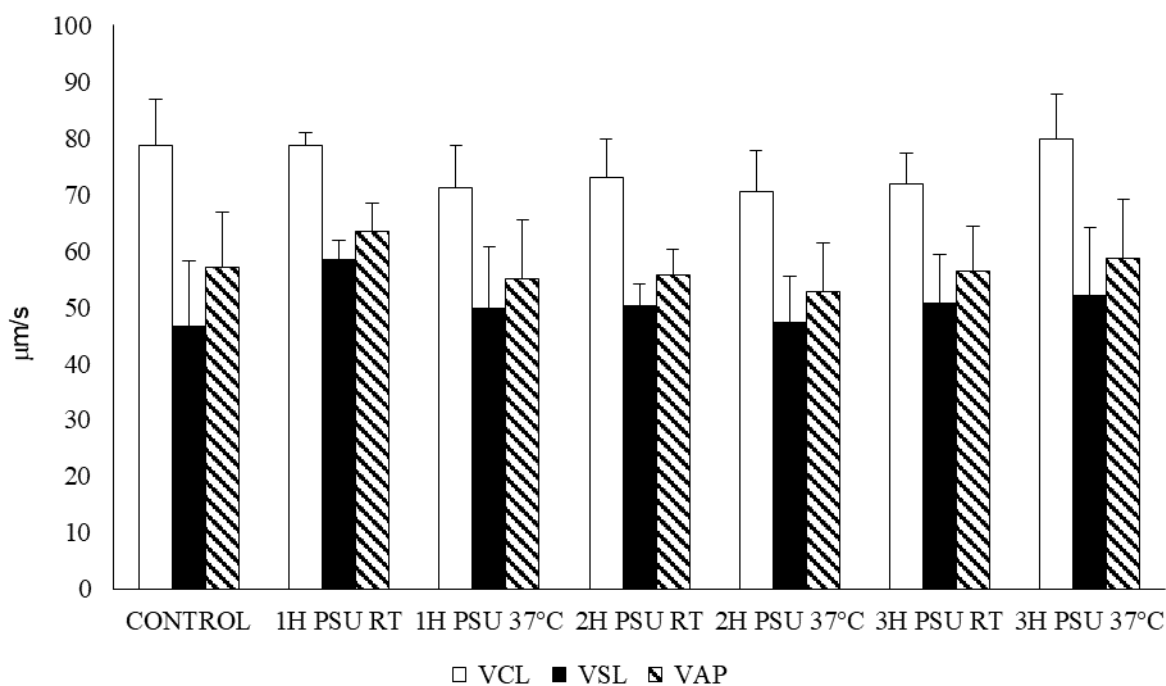
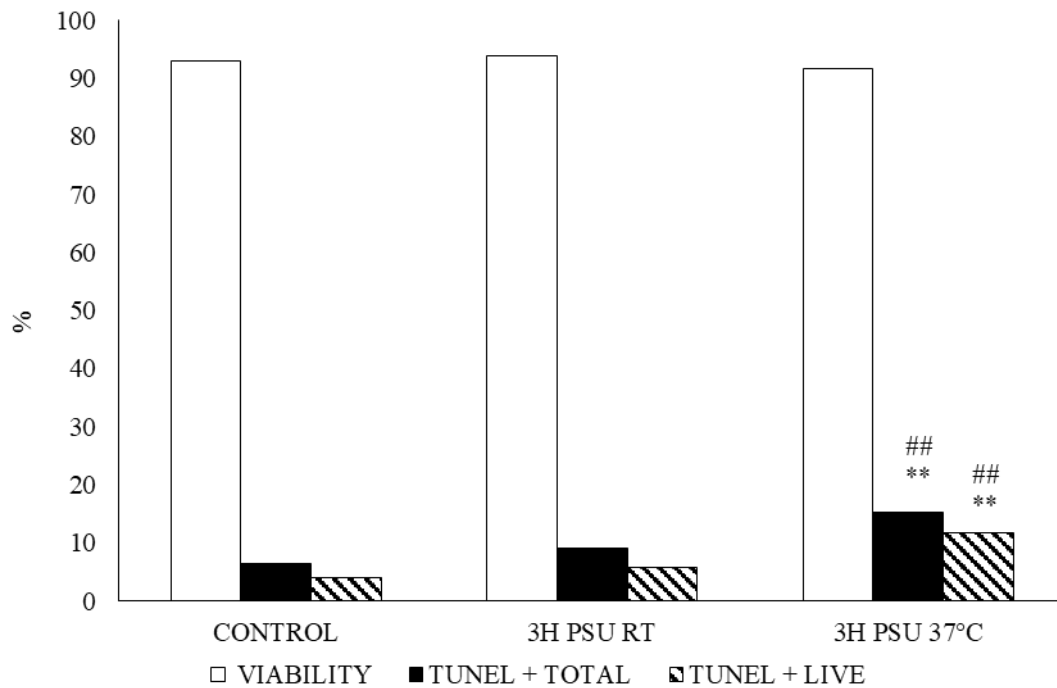


Figura 16b: Effetto della temperatura sui parametri cinetici in spermatozoi selezionati con swim up

Effetto della temperatura su vitalità e frammentazione del DNA dopo procedura di swim up

L'effetto della temperatura, su spermatozoi selezionati con la tecnica dello swim up, è stato indagato non solo sulla cinetica spermatica, ma anche sulla vitalità e sull'integrità genomica. I dati non hanno mostrato differenze significative tra i campioni analizzati per quanto riguarda la vitalità. Al contrario, la frammentazione genomica è risultata significativamente incrementata nel campione incubato 3h post swim up a 37° confrontato sia il controllo che con il campione incubato 3h post swim up a RT (CONTROL 6.4%; 3H PSU RT 9%; 3H PSU 37°C 15.3%). Inoltre, i dati hanno mostrato che la percentuale di spermatozoi vivi che presentavano un danno al DNA aumentava significativamente nel nel campione incubato 3h post swim up a

37° confrontato sia il controllo che con il campione incubato 3h post swim up a RT
 (CONTROL 3.9%; 3H PSU RT 5.7 %; 3H PSU 37°C 11.8%) (fig.17).



*Figura 17: Effetto della temperatura sulla vitalità spermatica e sull'integrità genomica in spermatozoi selezionati con swim up. ##: differenza altamente significativa rispetto al controllo ($p < 0,01$): **: differenza altamente significativa rispetto al campione di confronto ($p < 0,01$).*

Effetto della concentrazione su spermatozoi umani

Effetto della concentrazione sulla cinetica spermatica

I campioni a diverse concentrazioni sono stati ottenuti preparando diverse diluzioni seriali nel mezzo di coltura e sono stati, poi, analizzati per valutarne la cinetica. I dati non hanno mostrato differenze significative tra i campioni analizzati sia in termini di motilità totale e progressiva che in termini di parametri cinetici (fig.18a e 18b).

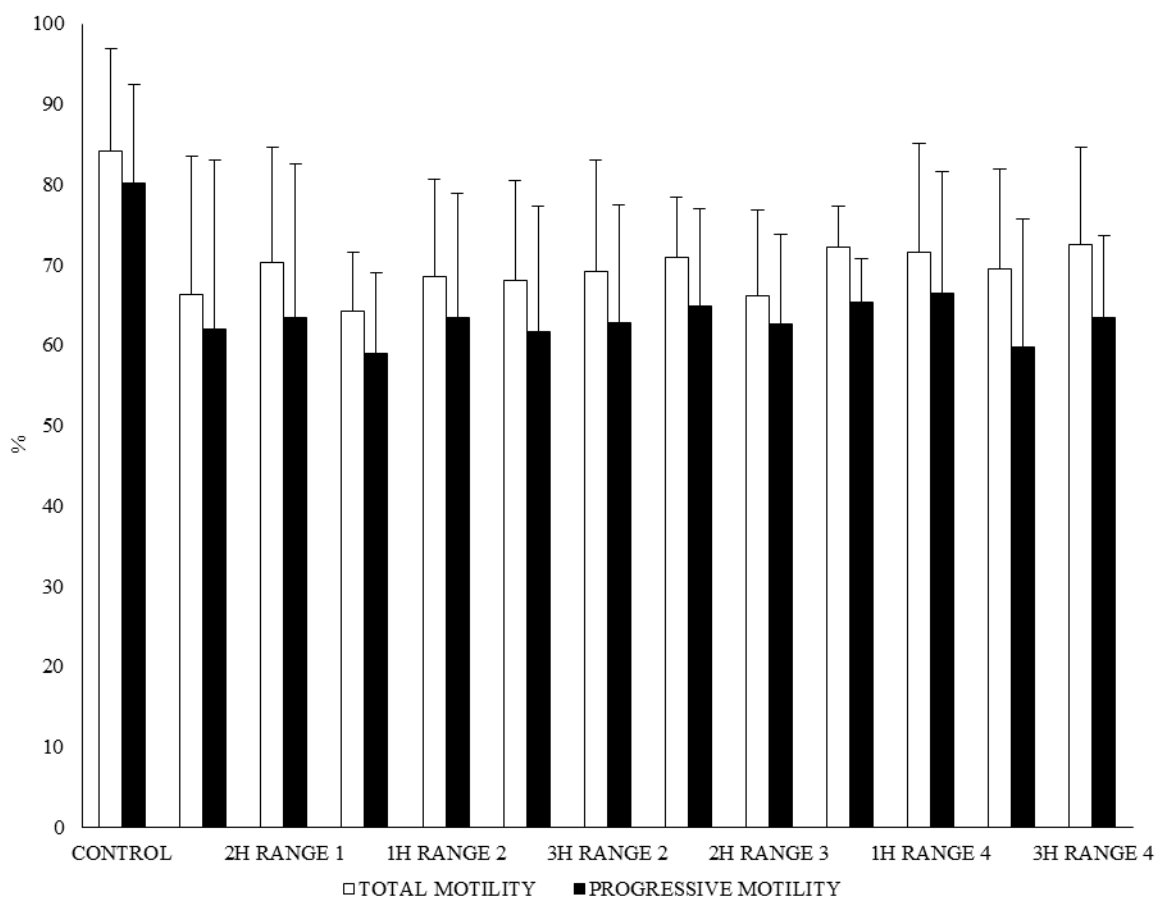


Figura 18a: effetto della concentrazione sulla motilità totale e progressiva

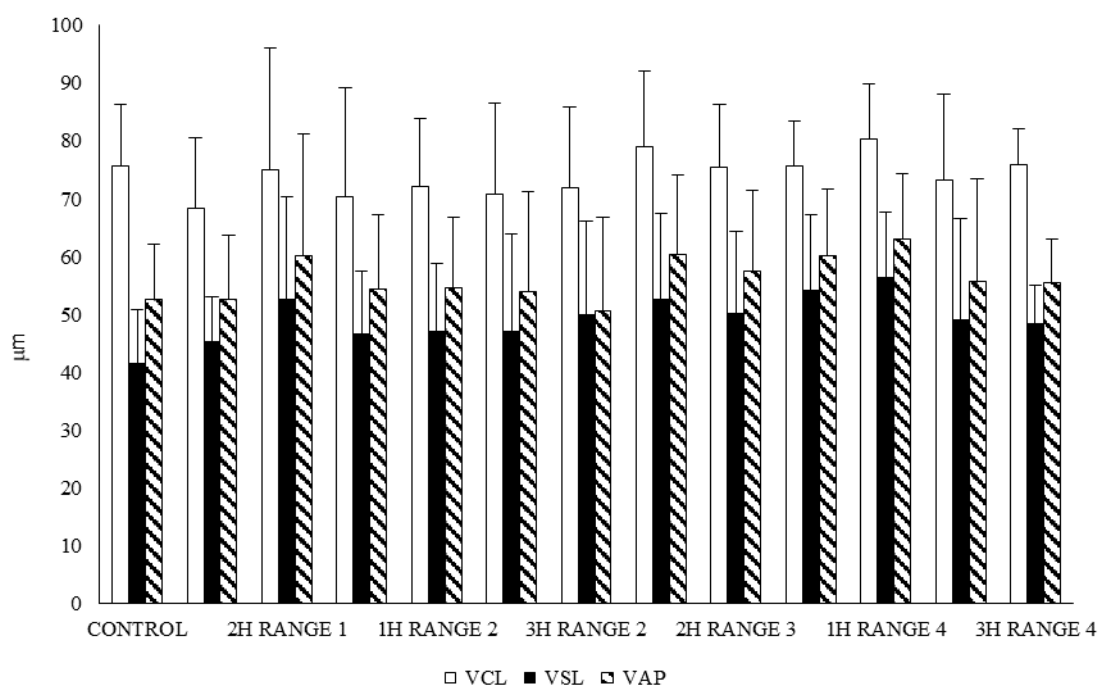
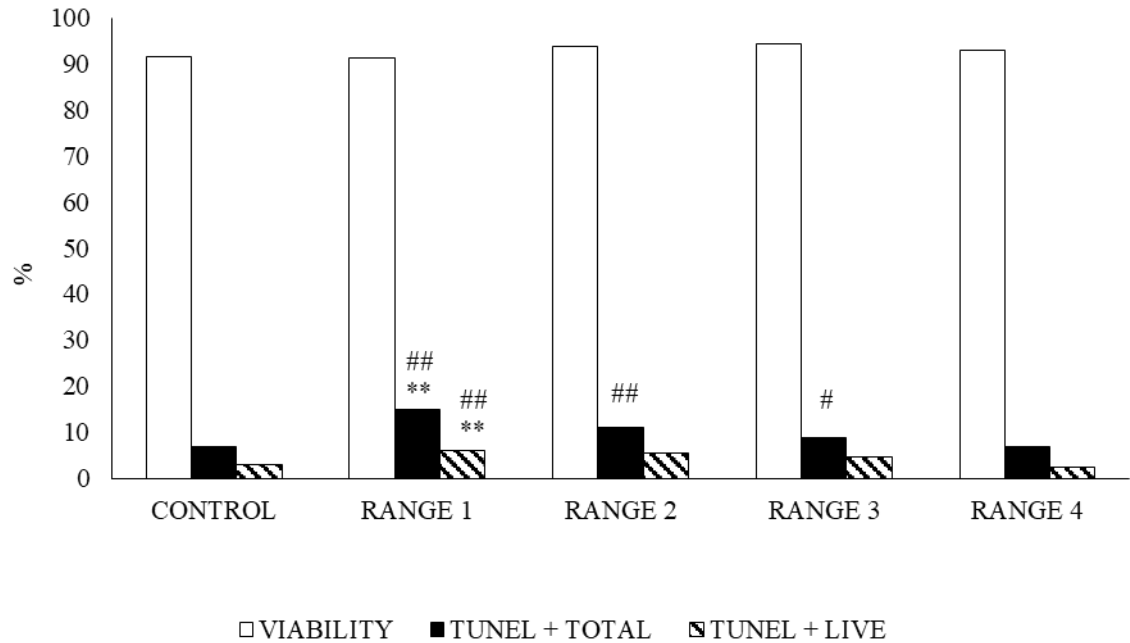


Figura 18b: effetto della concentrazione sui parametri cinetici

Effetto della concentrazione su vitalità e frammentazione del DNA

Anche in questo caso l'effetto della concentrazione è stato esaminato non solo sulla motilità e sulla cinetica spermatica, ma anche sulla vitalità e sulla frammentazione genomica. Per quanto riguarda la vitalità, dopo 3h di incubazione a 37° non si è notata alcuna differenza significativa in nessuno dei campioni esaminati. Al contrario, invece, sia per quanto riguarda la percentuale di spermatozoi con DNA frammentato, sia per quanto riguarda la percentuale degli spermatozoi vivi ma con danno al DNA, si è potuto osservare un incremento altamente significativo nel campione caratterizzato da una maggiore concentrazione spermatica sia rispetto al controllo sia rispetto agli altri campioni confrontati; si è evinto, dunque, un effetto concentrazione dipendente sia per gli spermatozoi con DNA frammentato, i Tunel positive total (CONTROL 7%; RANGE 1 15%; RANGE 2 11.1%; RANGE 3 8.7%;

RANGE 4 6.9%) che per i Tunel positive live (CONTROL 3%; RANGE 1 6%; RANGE 2 5.5; RANGE 3 4.7%; RANGE 4 2.5%) (fig.19).



*Figura 19: Effetto della concentrazione sulla vitalità spermatica e sull'integrità genomica in spermatozoi selezionati con swim up. #: differenza significativa rispetto al controllo ($p < 0,05$); ##: differenza altamente significativa rispetto al controllo ($p < 0,01$); **: differenza altamente significativa rispetto al campione di confronto ($p < 0,01$).*

Effetto del pretrattamento con antiossidanti e, successiva, induzione dello stress ossidativo esogeno su spermatozoi nel modello bovino

Effetto del pretrattamento con antiossidanti e, successiva, induzione dello stress ossidativo esogeno sulla cinetica spermatica

Gli esperimenti condotti per valutare la motilità spermatica hanno indicato che zinco, CoQ10 e D-Asp esercitano effetti protettivi sugli spermatozoi bovini che sono stati trattati con il sistema X-XO per indurre stress ossidativo. I dati hanno mostrato una diminuzione altamente significativa, dopo 3 ore, sia della motilità totale che di quella progressiva del campione X-XO sia rispetto al campione controllo che rispetto al campione Genadis. Nello specifico la motilità totale variava dal $44.8 \pm 14.7\%$ (controllo) al 27.5 ± 12.4 in X-XO, mentre rimaneva inalterata in Genadis ($46.6 \pm 13.97\%$). Ancora, la motilità progressiva variava dal $40.8 \pm 13.8\%$ (controllo) al $23.3 \pm 11.7\%$ in X-XO, mentre non subiva variazioni significative in Genadis ($43.3 \pm 12.8\%$) (fig.20a). L'analisi dei parametri cinetici, invece, ha mostrato che tra le diverse sub-popolazioni spermatiche non esistono variazioni rilevanti dei valori VCL, VSL e VAP (fig.20b).

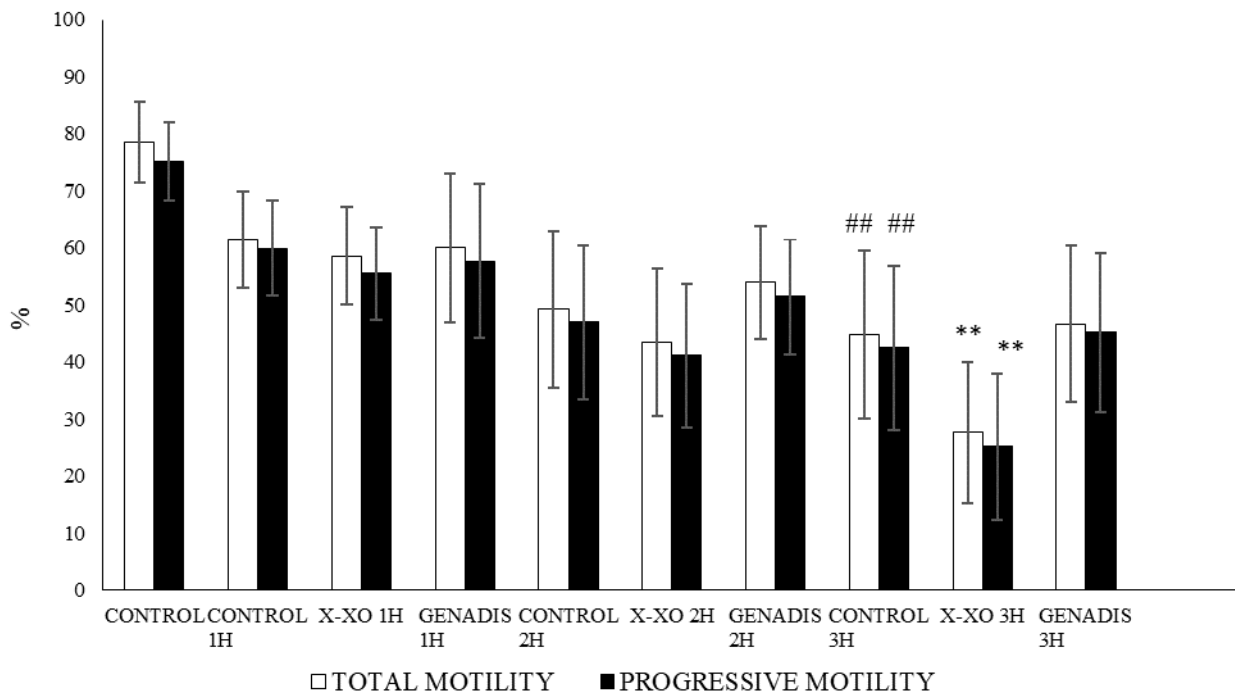


Figura 20a: Effetti di zinco, CoQ10 e D-Asp sulla motilità totale e sulla motilità progressiva. ## differenze altamente significative rispetto al controllo ($p < 0,01$); ** differenze altamente significative rispetto ai relativi campioni controllo e Genadis ($p < 0,01$).

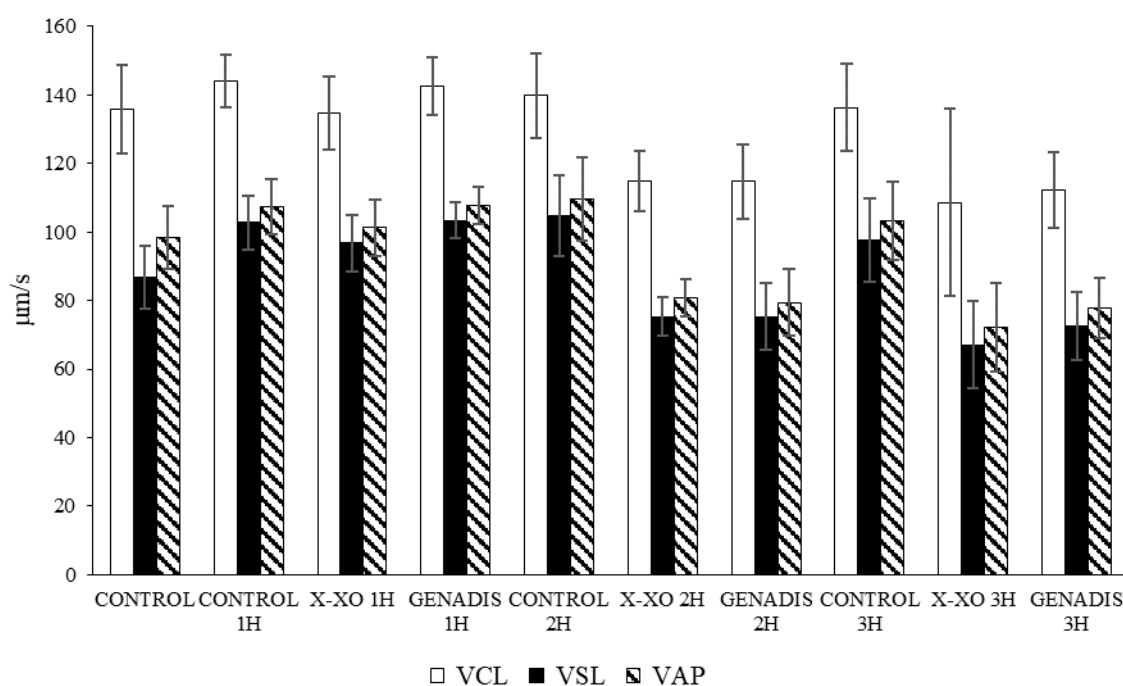
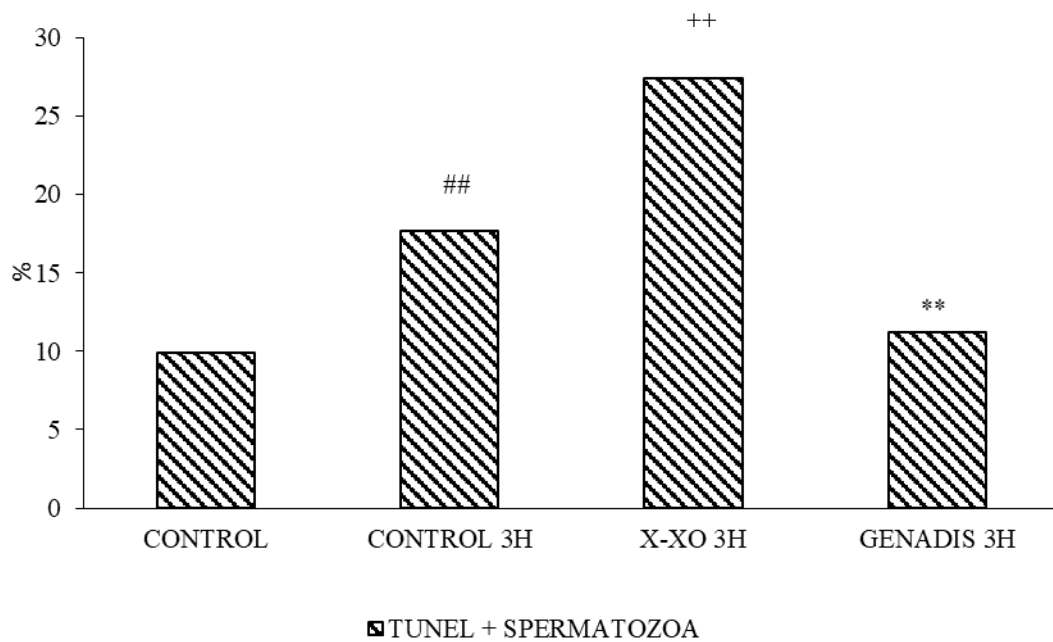


Figura 20b: Effetti di zinco, CoQ10 e D-Asp sui parametri cinetici

Effetto degli antiossidanti sulla frammentazione del DNA spermatico

L'effetto degli antiossidanti è stato valutato, non solo sulla cinetica spermatica, ma anche sull'integrità genomica. A questo scopo il campione di liquido seminale controllo ed i campioni controllo, X-XO e Genadis, a 3 ore, sono stati, sottoposti a Tunel assay. I risultati hanno mostrato che nel campione controllo e nel campione X-XO vi è stato un incremento altamente significativo della percentuale dei nuclei con DNA frammentato dopo 3 ore mentre nel campione Genadis si preservava il grado di frammentazione di partenza (CONTROL 9,9%; CONTROL 3H 17,7%; X-XO 27,4%; GENADIS 11,2%) (fig. 21-22).



*Figura 21: Effetto degli antiossidanti sulla frammentazione del DNA. ##: differenza altamente significativa rispetto al controllo ($p < 0,01$); **: differenza altamente significativa rispetto al campione di confronto ($p < 0,01$); ++ differenza altamente significativa rispetto al campione controllo e a GENADIS 3H ($p < 0,01$)*

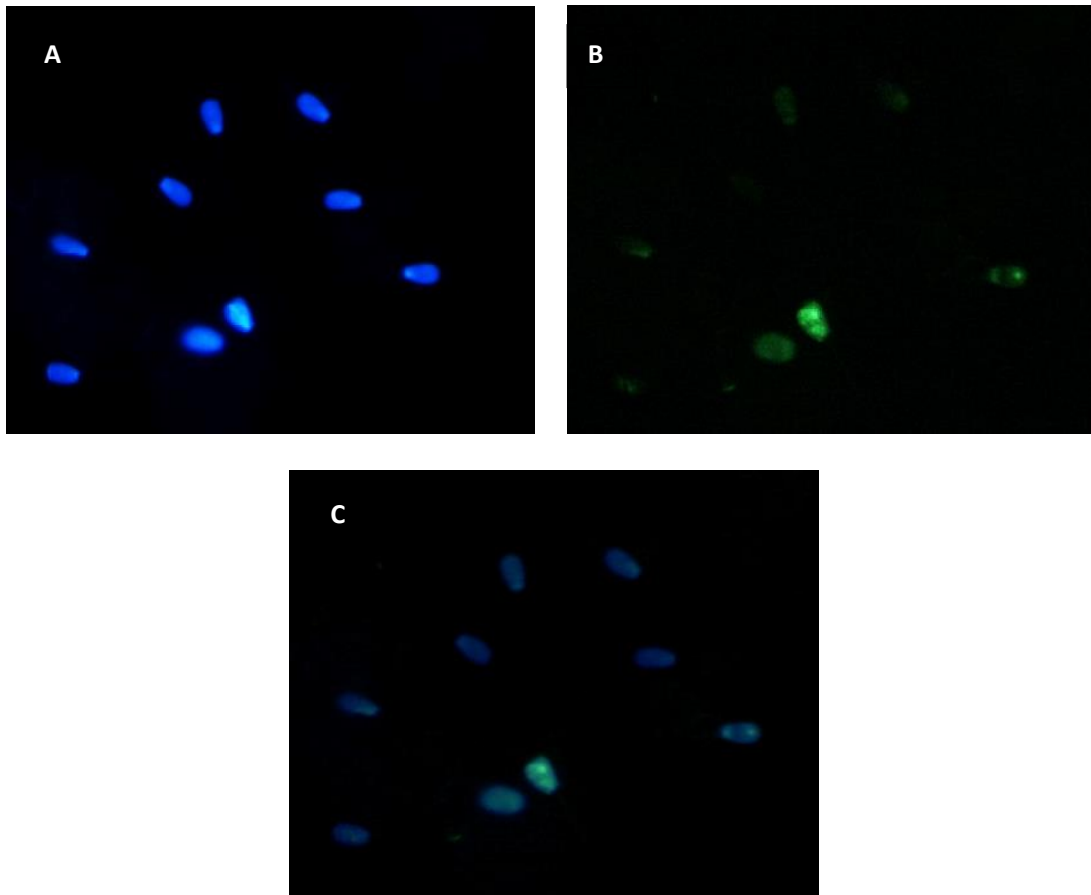


Figura 22: (A) Spermatozoi marcati con Hoechst 33342. (B) Spermatozoi marcati con TUNEL Assay. (C) Sovrapposizione delle immagini A e B.

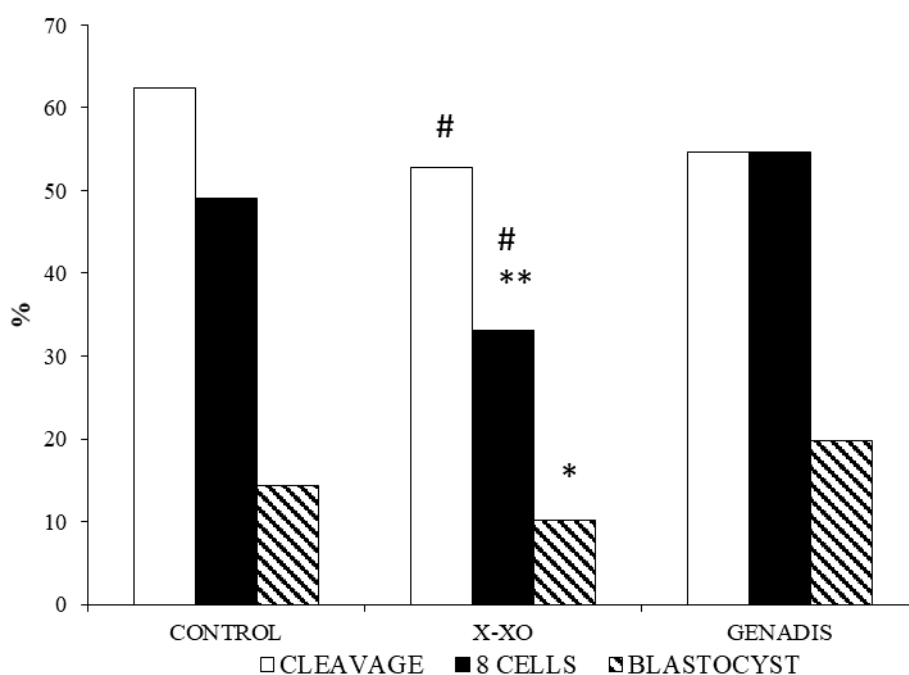
Effetti sulla qualità degli embrioni ottenuti da fecondazione con spermatozoi pretrattati con antiossidanti e sottoposti, successivamente, a stress ossidativo esogeno nel modello bovino

Fecondazione in vitro e coltura embrionale

Gli esperimenti di fecondazione *in vitro* sono stati effettuati per capire se il trattamento degli spermatozoi con zinco, D-Asp, e CoQ10 fosse in grado di migliorare la capacità di fecondazione e la capacità di sostenere lo sviluppo embrionale di spermatozoi nei quali è stato indotto stress ossidativo con il sistema X-

XO. I dati hanno indicato che c'era un decremento significativo delle percentuali di fecondazione del campione xantina-xantina ossidasi rispetto al controllo, mentre non vi erano differenze significative tra il campione Genadis e il controllo (CONTROL 62,4%; X-XO 52,8%; GENADIS 54,7%). Le percentuali di embrioni ad 8 cellule, ottenute in terza giornata, evidenziavano un decremento significativo nel campione, ottenuto fecondando ovociti con spermatozoi a cui era stato indotto uno stress ossidativo, sia rispetto al controllo che rispetto a genadis (CONTROL 49.1 %; X-XO 33.1%; GENADIS 54.6%).

Al giorno 8, invece, la competenza da parte degli ovociti, inseminati con le differenti subpopolazioni spermatiche, di sviluppare lo stadio di blastocisti era significativamente aumentata nel campione Genadis rispetto al campione X-XO ma restava paragonabile rispetto al campione controllo (CONTROL 14,4%; X-XO 10,1%; GENADIS 19,7%) (fig. 23).



*Figura 23: Effetti del pretrattamento con zinco, CoQ10 e D-Asp sulle percentuali di cleavage, 8 cellule e blastocisti. # differenza significativa rispetto al controllo ($P < 0,05$); * differenza significativa rispetto al campione Genadis ($P < 0,05$); ** differenza altamente significativa rispetto al campione Genadis ($P < 0,01$).*

Numero medio di cellule in blastocisti

La qualità delle blastocisti è stata valutata in termini di numero medio di cellule, valore indicativo dell'evoluzione dello sviluppo embrionale. Dai risultati ottenuti si è osservato che, in X-XO e Genadis, il numero medio di cellule è leggermente più alto rispetto al controllo, tuttavia le differenze non risultano essere significative (CONTROL $102,9 \pm 35$, X-XO $104,7 \pm 42,7$, GENADIS $104,7 \pm 39,4$) (fig.24).

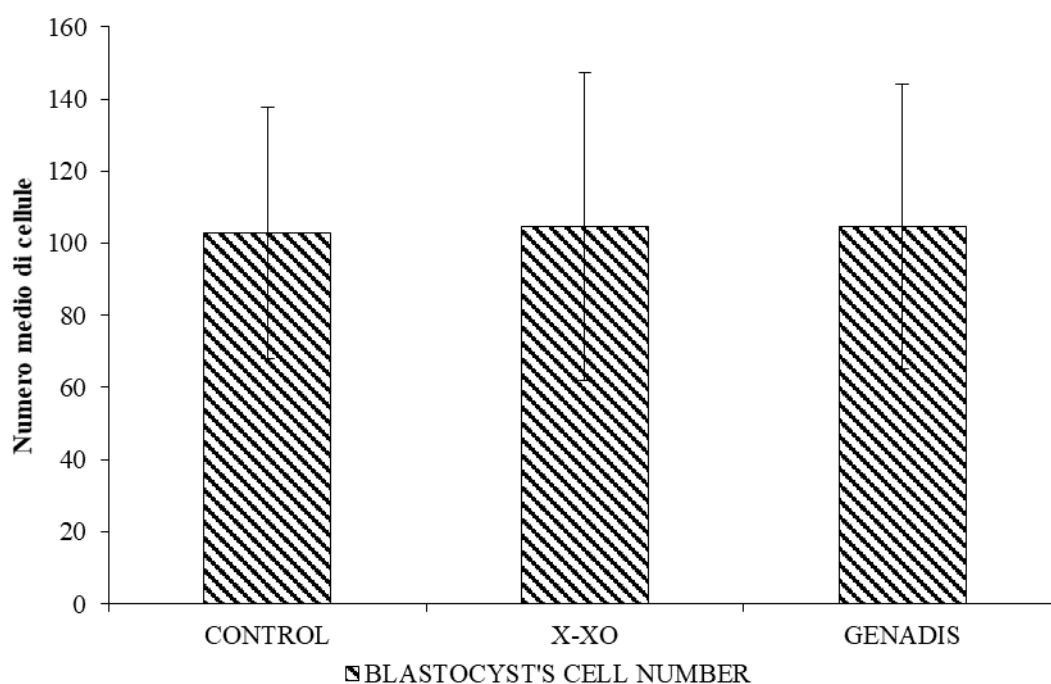
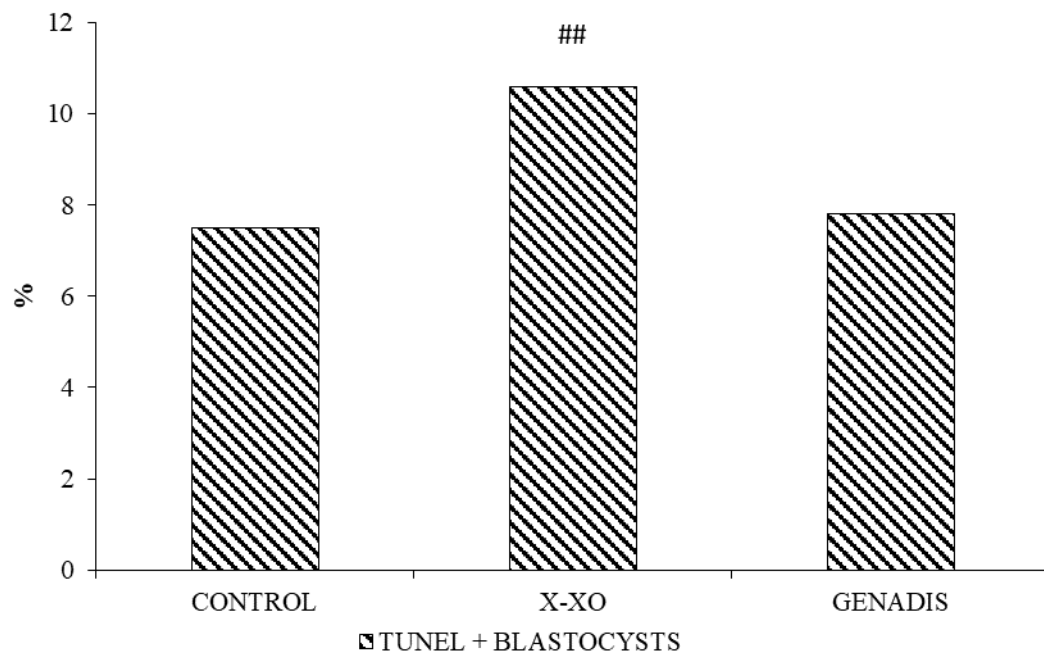


Figura 24: Effetti del pretrattamento con zinco, CoQ10 e D-Asp sul numero medio di cellule in blastociti.

Effetto degli antiossidanti sulla frammentazione del DNA in blastocisti

Lo step successivo è stato quello di andare a valutare la qualità delle blastocisti in termini di frammentazione del DNA cellulare. In seguito al saggio tunel si è osservato che nel campione X-XO il numero di cellule apoptotiche era nettamente superiore, in maniera altamente significativa, sia rispetto al controllo che rispetto a genadis, inoltre, la percentuale di nuclei apoptotici in quest'ultimo campione era paragonabile al controllo (CONTROL 7.5%; X-XO 10.6%; GENADIS 7.8%) (fig.25-26).



*Figura 25: Effetto di zinco, CoQ10 e D-Asp sulla frammentazione del DNA in blastocisti. ## differenze altamente significative rispetto al controllo ($P < 0,01$); ** differenze altamente significative rispetto al campione di riferimento ($p < 0,01$).*

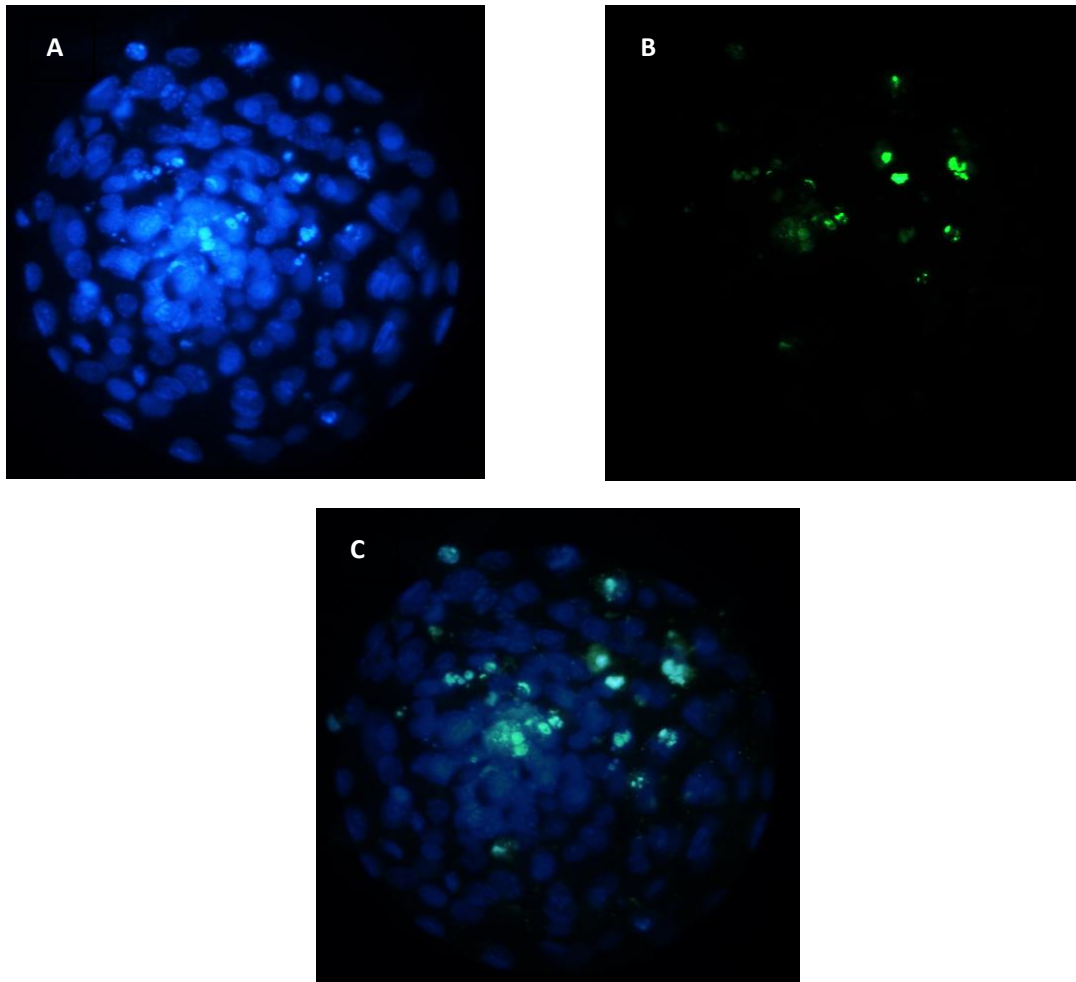
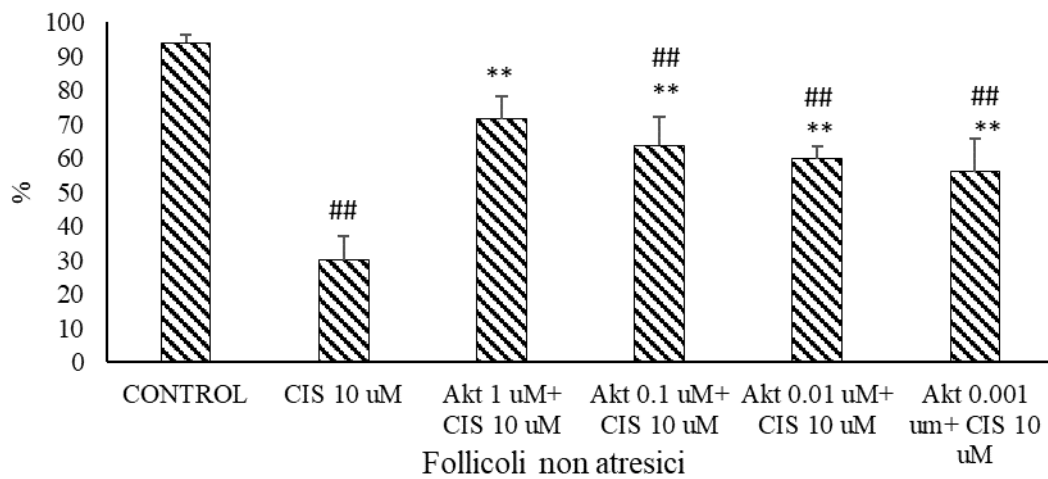


Figura 26:(A) Blastocisti marcata con Hoechst 33342. (B) Blastocisti marcata con TUNEL Assay. (C) Sovrapposizione delle immagini A e B.

Effetto dell'inibizione della via di segnalazione PI3K/PTEN/Akt contro i danni indotti da chemioterapici, sulla salute follicolare nel modello murino

Gli esperimenti volti a capire se l'inibizione della via di segnalazione PI3K/PTEN/Akt potesse proteggere l'ovaio dai danni indotti dai chemioterapici sono

stati svolti mediante coltura dei frammenti di ovaio di topo, pretrattati con l'inibitore di Akt e successivamente trattati con cisplatino. I risultati hanno mostrato che il pretrattamento con l'inibitore di Akt, a tutte le concentrazioni testate, ha un effetto protettivo contro i danni indotti da cisplatino; nei campioni pretrattati con l'inibitore, infatti, la percentuale di follicoli non atresici era significativamente più alta se confrontata con il campione trattato solo con cisplatino (CONTROL 93.8%; CISPLATINO 10 μ M 30%; Akt 1 μ M 71%; Akt 0.1 μ M 63.6%; Akt 0.01 μ M 59.7%; Akt 0.001 μ M 56%) (fig.27).



*Figura 27: Effetto dell'inibitore di Akt sulla salute ##: differenza altamente significativa rispetto al controllo ($p < 0,01$); **: differenza altamente significativa rispetto al campione di confronto ($p < 0,01$).*

DISCUSSIONE

Uno degli attuali focus di attenzione nel mondo scientifico riguarda la biologia riproduttiva e l'influenza delle tecniche di riproduzione assistita sulla salute dei nati. Sempre più coppie si rivolgono ai centri di PMA, poiché sia per ragioni mediche che per ragioni sociali, l'infertilità è in continuo aumento. Nel complesso si potrebbe dire, da un lato, che le pratiche ART hanno scopi benefici permettendo a coppie infertili di realizzare il loro desiderio procreativo, dall'altro però intorno a tale tema si sollevano forti questioni mediche, giuridiche ed etiche circa la possibilità che le tecniche stesse possano avere conseguenze negative sulla salute dei nati. Sempre più

studi, oramai, affrontano il problema rappresentato dalla possibilità che le tecnologie di riproduzione assistita possano comportare l'insorgenza di disordini e complicazioni relative alla salute dei bambini nati.

Dal 1978, anno in cui veniva alla luce la prima bambina nata da fecondazione *in vitro*, c'è stata una progressiva e rapida evoluzione sia per quanto riguarda la strumentazione che le metodiche vere e proprie necessarie alla coltura gametica ed embrionale. Ogni piccolo cambiamento negli ultimi decenni può aver influenzato, in qualche modo, la salute dei concepiti ma, essendo le tecnologie di riproduzione assistita piuttosto recenti e suscettibili a diversi cambiamenti, i loro effetti a breve e a lungo termine sono ancora poco chiari ed oggetto di numerose indagini. Un'eccezionale varietà di fattori quali ad esempio, le metodiche di trattamento delle cellule germinali, la composizione dei mezzi, la temperatura, la luce ed il pH del microambiente in cui sono coltivati gameti ed embrioni, può determinare il successo di una tecnica e, al contempo, avere conseguenze che possono manifestarsi nel nascituro ma anche nell'uomo adulto. La letteratura, infatti, è ricca di dimostrazioni del fatto che l'ambiente in cui si coltivano i gameti e si sviluppano gli embrioni, sia esso *in vivo* o *in vitro*, influenza lo sviluppo embrionale e può avere il suo peso nella comparsa di sindromi cardiovascolari e metaboliche nell'individuo adulto. La dieta, lo stile di vita della coppia, lo stress o, ancora, fattori ambientali che agiscono da soli o in combinazione, sono tutti elementi che *in vivo* alterano la qualità gametica e che possono riflettersi non solo sullo sviluppo embrionale, ma anche sulla salute dell'individuo a breve e a lungo termine (Jans et al., 2015; McEvoy et al., 2001).

È chiaro, quindi, che a prescindere dalle tecniche di riproduzione assistita, l'embrione possa essere soggetto ad una serie di insulti che si riflettono sul suo

sviluppo e sulla sua salute; ma se da un lato ci sono i fattori che *in vivo* vanno ad influenzare la condizione di salute e la funzionalità dei gameti, dall'altro ci sono altrettanti fattori *in vitro*, come le normali manipolazioni necessarie per una qualsiasi tecnica di PMA, che possono indurre stress in spermatozoi, ovociti ed embrioni, alterando i tassi di concepimento, causando sofferenza embrionale e agendo sulla salute dell'individuo dall'età pediatrica fino a quella adulta. La salute dei gameti e, in particolare degli spermatozoi, ha una forte rilevanza, diversi lavori dimostrano, infatti, che lo stato di salute della cellula germinale maschile agisce proprio condizionando non solo lo sviluppo embrionale, ma anche i tassi d'impianto, le interruzioni spontanee di gravidanza e la salute dei nati.

Tra le cause maggiori di disfunzione spermatica si colloca lo stress ossidativo che potrebbe essere uno dei principali responsabili di quella che viene definita "infertilità idiopatica" (Saalu 2010). L'ambiente *in vivo* è ricco di fonti di ROS perché sia le cellule germinali che gli embrioni fanno affidamento sulla fosforilazione ossidativa mitocondriale come fonte di energia e tale processo è accompagnato, appunto, dalla formazione di radicali liberi (du Plessis et al., 2008). La fosforilazione ossidativa è la causa principale *in vivo* di formazione di ROS. L'eccesso di radicali liberi, proveniente da questo processo, è causa dello stress ossidativo iniziale ed induce la perossidazione lipidica che si conclude con la produzione di aldeidi lipidiche come ad esempio 4-idrossinonenale; tale aldeide si lega, a livello mitocondriale, alle proteine della catena di trasporto degli elettroni, stimolando la generazione di altre specie reattive dell'ossigeno. Lo stesso feedback positivo stimola, ancor di più, la perossidazione lipidica che porterà poi la cellula in apoptosi. Sicuramente la fosforilazione ossidativa rappresenta un'importante fonte di ROS ma queste hanno

origini molto variabili. Una serie di componenti primari possono avviare lo stress ossidativo nella linea germinale maschile tra cui le infezioni, l'età, l'obesità e l'esposizione ad una varietà di fattori ambientali avversi. I comportamenti e le pratiche sociali di un uomo si riflettono prepotentemente qualità dei gameti e sui suoi discendenti; è risaputo che sigarette, droghe e alcool possono indurre teratogenesi. Il fumo, nel maschio, è strettamente correlato ad un impoverimento della qualità del liquido seminale poiché la nicotina, il cadmio e gli alcaloidi presenti nelle sigarette favoriscono la produzione di radicali liberi e, inoltre, impediscono il buon funzionamento di OGG1, enzima impiegato nel riparo del DNA spermatico determinando, così, una maggiore incidenza di aborti e di predisposizione al cancro infantile nei nati (Aitken et al., 2014).

Oltre lo stile di vita, numerosi altri fattori *in vivo* concorrono ad influenzare la qualità spermatica ed embrionale. Anche l'età paterna ha la sua importanza in tale ambito, si sa che gli uomini in età avanzata non smettono di produrre spermatozoi ma è dimostrato anche che la loro qualità è età dipendente e che mostrano un aumento del danno ossidativo al DNA con l'avanzare dell'invecchiamento (Paul C et al., 2011). Lo stesso eiaculato umano contiene potenziali fonti di ROS, essendo costituito da diversi tipi di cellule, come spermatozoi immaturi, cellule tonde delle diverse fasi della spermatogenesi, leucociti e cellule epiteliali. Difetti del meccanismo di maturazione epididimale o durante il rilascio degli spermatozoi dall'epitelio germinativo, nel corso della spermatogenesi, possono comportare la presenza di un eccesso di citoplasma detto "goccia citoplasmatica" che rappresenta una fonte importante di ROS, con conseguenze negative sulla funzione spermatica. Anche,

solo, la semplice morfologia alterata dello spermatozoo aumenta lo stress ossidativo (Chemes EH et al.,2003).

Sebbene gli spermatozoi producano fisiologicamente ROS per promuovere diversi processi fisiologici, come la capacitazione, la reazione acrosomiale e la fusione con l'ovocita, quando i livelli di queste specie reattive superano la capacità antiossidante della cellula si crea uno stato di stress ossidativo, che va a compromettere il processo di fecondazione e anche lo sviluppo embrionale (Aitken et al. 2010).

È stato già dimostrato quanto determinati trattamenti durante una pratica di PMA, inducono a livello spermatico uno stato di stress ossidativo che, in particolar modo, inficia la qualità embrionale in termini di numero medio delle cellule e di percentuale di nuclei con DNA frammentato, e quanto, poi, l'utilizzo di antiossidanti, che contrastano lo stress, preservi la qualità spermatica influenzando positivamente, proprio, la qualità embrionale (Talevi et al., 2013; Gualtieri et al.,2014).

Grazie alle tecniche di fecondazione sono venuti al mondo circa cinque milioni di bambini e tale numero è in costante aumento (Centri per il Controllo e la Prevenzione delle malattie, 2012). Queste tecniche richiedono la manipolazione dei gameti al di fuori del loro ambiente naturale per facilitare il processo di fecondazione; per questa ragione oggi le tecniche di PMA destano non poche preoccupazioni circa le conseguenze che possono avere, in termini di danni iatrogeni, su gameti ed embrioni.

Mentre *in vivo* l'eccesso di specie reattive dell'ossigeno è controllato dai sistemi antiossidanti endogeni, *in vitro* questo tipo di controllo viene a mancare (Agarwal et al., 2014).

Come già accennato, lo stato di salute dello spermatozoo rappresenta un punto cruciale dai primi stadi di fecondazione allo sviluppo embrionale e gioca un ruolo decisivo per l'impianto embrionale e per lo stato di salute del nato stesso (Tamara et al., 2011). Lo stress ossidativo limita il potenziale di fecondazione delle cellule germinali maschili perché è causa di un danno ai lipidi ed alle proteine della membrana plasmatica, riducendo così, dapprima la motilità spermatica e poi le possibilità di una fusione tra spermatozoo ed ovocita necessaria per la fecondazione e, inoltre, induce un forte danno al DNA (Jones R et al.,1979; Christova Y et al.,2004; Tremellen et al., 2008).

Uno dei target più sensibili dello stress ossidativo è, proprio, il DNA nucleare spermatico. Un eccesso di ROS induce la modifica della guanina trasformandola in 8-idrossiguanosina (l'8-OH-dG) che rappresenta uno dei marker principali di danno genomico (Cooke, 2000). Gli spermatozoi possono avere un grado variabile di frammentazione del DNA e le varie procedure di routine di una pratica ART possono aumentare proprio il livello basale di frammentazione genica e ciò è stato correlato allo stress ossidativo ed alle conseguenze già discusse. La presenza di un danno al DNA induce lo spermatozoo a tentare di ripararlo, poiché, però, uno spermatozoo che presenta un danno genomico è comunque in grado di fecondare l'ovocita, se tale danno non viene riparato dallo spermatozoo tocca proprio all'ovocita occuparsene; nel caso in cui nessuna delle due cellule sia stata in grado di porre rimedio all'errore, il danno si perpetuerà nello zigote e questo potrebbe dare una spiegazione alle patologie cardiovascolari, metaboliche e, addirittura, al cancro riscontrate nella prole dei padri che presentavano un danno al DNA stress ossidativo dipendente (Aitken et al.,2014).

È chiaro, dunque, che la frammentazione del DNA rappresenta un fattore importante nell'eziologia dell'infertilità maschile. La sovrapproduzione delle specie reattive dell'ossigeno, che portano allo stress ossidativo, potrebbe verificarsi in varie fasi durante le ART. La preparazione per affrontare una qualsiasi delle ART prevede la selezione di spermatozoi di buona qualità che a sua volta comporta una manipolazione *in vitro* degli spermatozoi stessi; questa manipolazione comprende, ad esempio, procedure quali, centrifugazione, crioconservazione, esposizione a temperature e tensioni di ossigeno non fisiologiche, ognuna delle quali può compromettere la struttura e la funzione degli spermatozoi (Agarwal et al., 2014). Come *in vivo* anche *in vitro* le fonti di ROS sono diverse, i gameti, ad esempio, sono inevitabilmente esposti alla luce ed è stato dimostrato che la luce, nello spettro del visibile, ha effetti deleteri sui gameti e sullo sviluppo embrionale (Ottosen et al., 2007). La luce blu, in particolare, potrebbe generare perossido di idrogeno ed alterare gli enzimi della catena respiratoria (Squirrell et al., 1999; Hockberger et al., 1999). Altra fonte di ROS è rappresentata dalla composizione dei mezzi usati durante la coltura dei gameti e degli embrioni pre-impianto, la presenza di ioni metallici potrebbe scatenare la formazione di radicali liberi nelle cellule, influenzandone direttamente la qualità e di conseguenza il tasso di successo delle ART (Agarwal et al., 2006; Guerin et al., 2001). Inoltre i mezzi di coltura vanno incontro a variazioni di pH e anche l'omeostasi intracellulare è altamente sensibile a tali cambiamenti, infatti, un incremento del pH rafforza la condizione di stress ossidativo in cui può trovarsi la cellula stessa (Will MA et al., 2011). Ancora, durante le pratiche ART la centrifugazione, che rappresenta uno dei trattamenti di routine per rimuovere il plasma seminale nelle tecniche di preparazione degli spermatozoi, è una forte fonte

di ROS (Shekarriz et al., 1995; Henkel et al., 2003). Uno degli elementi che assume estrema rilevanza è costituito dalla temperatura; la temperatura di incubazione degli spermatozoi rappresenta una condizione di coltura comune in tutte le tecniche di riproduzione assistita.

La spermatogenesi è un processo complesso e multi-step coinvolto nella proliferazione e differenziazione degli spermatogoni in spermatozoi maturi. Tale processo è molto sensibile sia a stress chimici che fisici, la normale funzione testicolare è, infatti, dipendente dalla temperatura; nella maggior parte dei mammiferi, i testicoli, nella sacca scrotale, sono mantenuti ad una temperatura che oscilla tra i 2°C e gli 8°C inferiore a quella del corpo (Harrison e Weiner, 1948; Ivell, 2007). Diversi sono i fattori che possono indurre un aumento della temperatura tra questi ad esempio: uno stile di vita sedentario, professioni che richiedono di lavorare ad alte temperature o ancora disordini clinici (Mieusset et al., 1987-2007; Thonneau et al., 1998).

Si conosceva già l'effetto deleterio dell'ipertemia testicolare, sulla fertilità maschile, fin dai tempi di Ippocrate, come causa di una produzione spermatica ridotta (Dada et al., 2003). L'effetto nocivo dello stress da calore è stato ben dimostrato sia nel modello animale che nell'uomo (Lue YE et al. 2002); sia stimoli endogeni che esogeni, inducendo un aumento della temperatura, possono diminuire la concentrazione spermatica, alterare la motilità e ridurre il numero di spermatozoi morfologicamente normali (Mieusset et al., 1987; MacLeod J et al., 1941; Procope BJ 1965; Saikhun J et al., 1998; Carlsen E et al., 2003). Nei topi è stato dimostrato, inoltre, che lo stress termico provoca l'apoptosi delle cellule germinali ed induce un'alterazione dell'integrità del DNA e dell'impacchettamento della cromatina

associati ad una precoce perdita embrionale (Rockett et al., 2001; 2004; Banks et al., 2005). Rockett mostra, ancora, che l'eccessivo calore down regola geni implicati nel riparo del DNA e diminuisce la produzione di antiossidanti, rendendo ancor più esposti allo stress ossidativo le cellule spermatiche (Rockett et al., 2001). Negli uomini, invece, un interessante studio *in vivo* del 2007 mostra che, questi esposti ad alte temperature per un periodo di tempo di tre anni presentavano una ridotta motilità spermatica e che tale condizione poteva essere, in alcuni casi, resa reversibile se esposti a temperature ottimali (Shefi et al., 2007).

Il genoma delle cellule germinali maschili è fortemente suscettibile ad errori, uno degli aspetti maggiormente influenzati dalla temperatura è l'integrità genetica la quale, come già detto, gioca un ruolo determinante nell'infertilità maschile e nell'outcome riproduttivo (Borini et al., 2006). E' stato mostrato in diverse specie quanto la temperatura di incubazione vada ad influenzare la frammentazione del DNA; negli elefanti, ad esempio, incubare per lungo tempo gli spermatozoi a 37° C induce un incremento della percentuale di DNA frammentato (Imrat et al., 2012). Nei topi, inoltre, si è evidenziato che l'incubazione anche per breve tempo a temperature sia basse che ad alte, nello specifico 4°C e 37°C, riduce la motilità e l'integrità membranaria (Varisli et al., 2013), indicando che non solo l'ipertermia è dannosa per lo spermatozoo ma anche una drastica ipotermia.

Ciò nonostante, solo ancora pochi si sono interrogati sugli effetti che possono avere le condizioni di temperatura cui vengono sottoposti *in vitro* gli spermatozoi nel corso delle procedure ART. I cambiamenti di temperatura a cui è soggetto lo spermatozoo durante l'handling di routine delle pratiche ART determinano una serie di stress fisici e chimici che si traducono in cambiamenti anche alla superficie dello spermatozoo i

quali inficiano la qualità e la funzionalità spermatica stessa (Tamara et al., 2011). Diversi lavori hanno dimostrato che l'incubazione a 37°C, tipica durante la preparazione spermatica, a lungo termine riduce la motilità e la vitalità degli spermatozoi (Calamera JC et al.,2001; Lachaud C et. Al.,2004). A conferma di ciò un lavoro di qualche anno fa, in cui i campioni di seme fresco venivano esaminati dopo diverse ore sia a temperatura ambiente che a 37°C mostra una significativa diminuzione della motilità tempo-dipendente; il trattamento a 37°C riduce la motilità in misura maggiore, e più rapidamente rispetto a quello a RT, e con il tempo aumenta anche la percentuale del DNA fragmentation index (DFI) (Matsuura et al., 2010). Ancora altri studi mostrano che l'incubazione degli spermatozoi alla temperatura di 37° C, in assenza di specifiche tecniche di selezione come lo Swim- Up, comporta una forte vacuolizzazione nucleare rispetto a spermatozoi dello stesso eiaculato incubati a temperatura ambiente (Schwarz et al., 2012; Peer et al.,2007). Anche dopo opportune tecniche di selezione come swim up o gradiente di densità, però, l'incubazione ad elevate temperature per tempi prolungati risulta dannosa per gli spermatozoi, sia in termini di motilità e morfologia che in termini di vitalità (Thijssen et al., 2014).

È evidente, quindi, che *in vitro* ci sono molteplici sorgenti di ROS che possono inficiare la qualità gametica ed embrionale e dunque, potenzialmente, qualsiasi procedura ART può danneggiare la qualità spermatica (Yelumalai et al.,2012).

I danni estrinseci agli spermatozoi potrebbero essere particolarmente allarmanti nelle tecniche di fecondazione perché vengono meno tutti i meccanismi di selezione naturali e, dunque, gli effetti dei danni potrebbero eventualmente manifestarsi sull'embrione e sulla prole. Per capire come lo stress ossidativo possa influenzare

negativamente la fecondazione, lo sviluppo embrionale ed anche esercitare effetti a lungo termine sui nati, è necessario capire in che modo i fattori esterni possano indurre danni iatrogeni agli spermatozoi durante le ART.

In virtù di quanto appreso dalla letteratura, quindi, durante il mio percorso di dottorato mi sono dedicata anche ad una parte sperimentale volta ad indagare come alcune procedure di manipolazione *in vitro* possano influenzare lo stato di salute dei gameti maschili, creando uno stato di stress ossidativo che va a compromettere, proprio, la qualità gametica. Con l'ausilio del modello animale bovino, poi, in una seconda parte sperimentale ho analizzato le conseguenze sulla qualità embrionale di embrioni ottenuti da fecondazioni con spermatozoi che hanno subito un danno ossidativo esogeno.

Parte sperimentale I

In questa prima fase ho analizzato l'effetto di due diverse temperature, temperatura ambiente (RT) e 37°C, in termini di motilità, vitalità e frammentazione del DNA su spermatozoi umani selezionati o non con lo swim up e, inoltre, ho valutato variazioni della qualità spermatica in spermatozoi coltivati a diverse concentrazioni.

I risultati hanno mostrato che la qualità spermatica è meglio preservata a temperatura ambiente rispetto che a 37°C, sia per gli spermatozoi non selezionati che per quelli selezionati mediante swim up e che lo stesso si può dire per gli spermatozoi coltivati a basse concentrazioni.

Nella prima parte degli esperimenti ho incubato gli spermatozoi umani per 1 ora a due diverse temperature: temperatura ambiente (RT) e 37 ° C; si è visto che la differenza di temperatura non influenza né la motilità totale, né la motilità progressiva e nemmeno i parametri cinetici in disaccordo con Thijssen che, invece,

ha riportato, nell'uomo, una significativa riduzione della motilità in seguito all'incubazione a 37 ° C e, anche, con Craig e Varisli che hanno riferito che l'incubazione ad alta temperatura pregiudica la motilità degli spermatozoi nei tori e nei topi (Thijssen et al. 2014; Craig et al 2015; Varisli et al., 2013). Al contrario Helppi J. nel 2016 ha riferito che nei topi l'elevata temperatura non compromette la motilità spermatica (Helppi J et al., 2016).

Mediante tecniche di fluorescenza ho poi analizzato, su questi stessi campioni, vitalità e frammentazione del DNA; i risultati, per quanto riguarda la vitalità hanno mostrato che essa diminuisce notevolmente a 37 ° C rispetto al campione controllo e al campione RT in accordo con Knox che ha riportato una riduzione della vitalità a 37 ° C tempo dipendente (Knox R.V 2015). Si presume che quando gli spermatozoi vengono incubati a temperature più basse, adottino uno stato di riposo, che consenta loro di preservare l'energia; questa ipotesi spiega, probabilmente, la ridotta sopravvivenza degli spermatozoi a 37 ° C rispetto alle basse temperature (Thijssen et al., 2014). Nel 2009, Gallup ha proposto "l'ipotesi di attivazione" come meccanismo per la capacitazione degli spermatozoi *in vivo*. Ha ipotizzato che l'aumento della temperatura quando gli spermatozoi entrano nel tratto riproduttivo femminile potrebbe agire come meccanismo di innesco per l'attivazione degli spermatozoi, rendendoli iperattivi (Gallup, 2009). Tale teoria potrebbe essere una spiegazione al decremento della vitalità ad alte temperature.

L'ultimo parametro che ho preso in considerazione è stata la frammentazione del DNA, la quale aumenta significativamente nel campione incubato a 37°C rispetto sia al campione controllo che a quello a temperatura ambiente. Questo risultato è in accordo con un lavoro del 2010 di Rieko Matsuur il quale riporta che la percentuale

dell'indice di frammentazione del DNA a RT era significativamente inferiore confrontata con la stessa a 37°C dopo lunghi tempi di incubazione (Matsuur et al.,2010); risultato simile è mostrato nello studio di Dalzell, che ha mostrato che la frammentazione del DNA nelle cellule spermatiche aumenta significativamente dopo 4 ore di incubazione a 37°C (Dalzell et al.,2004). Inoltre, Hammadeh, in un lavoro del 2001, ha riportato un significativo aumento degli spermatozoi che presentavano cromatina de-condensata dopo incubazione *in vitro* a 37°C per 24 ore (Hammadeh et al.,2001). Aitken più recentemente riporta, inoltre, che vi è una correlazione tra la formazione di 8OHdG e il danno del DNA ad elevate temperature, concludendo che la maggior parte dei danni del DNA negli spermatozoi è indotta da ossidazione (Aitken et al.,2014). Si potrebbe, dunque, suggerire che le procedure di handling delle cellule spermatiche dovrebbero essere eseguite a RT anziché a 37°C, poiché una prolungata manipolazione degli spermatozoi a 37°C risulta dannosa per la morfologia nucleare spermatica. Il risultato più interessante che ho potuto constatare è che in un'ora di incubazione a 37°C aumenta la percentuale di spermatozoi vivi con DNA frammentato. Probabilmente il DNA danneggiato non attiva il percorso di apoptosi nell'ora di cultura. Tale esito è particolarmente allarmante perché lo spermatozoo con DNA frammentato non presenta alterazioni nella morfologia, per cui durante una tecnica di PMA come la ICSI l'operatore non potrà essere in grado di distinguere uno spermatozoo con DNA integro da uno con DNA danneggiato, essendo entrambi vivi e di buona morfologia, rischiando così di procedere ad una fecondazione di un ovocita con uno spermatozoo che presenta frammentazione genomica. Come già detto in precedenza, i danni genomici negli spermatozoi influenzano lo sviluppo degli embrioni e potrebbero avere conseguenze sulla salute

del nato quali ad esempio una maggiore inclinazione al cancro infantile (Kumar et al., 2015; Wright et al., 2014)

Nella seconda parte degli esperimenti ho incubato gli spermatozoi selezionati mediante swim up per 3 ore a due diverse temperature: temperatura ambiente e 37°C. Le tecniche di manipolazione dell'eiaculato, come centrifugazione gradiente di densità e swim-up, selezionano spermatozoi con più elevata integrità del DNA (Marchesi et al. 2010). Questi tipi di tecniche selezionano i migliori spermatozoi in termini di motilità e morfologia. Morales ha riportato, invece, che la procedura di swim up, nel cinghiale, potrebbe attivare le caspasi ed indurre danni al DNA, è possibile che questi eventi possano essere correlati alla centrifugazione necessaria per il procedimento stesso dello swim up (Morales et al.,2012).

La differenza di temperatura, negli spermatozoi selezionati, non influenza né la cinetica né la vitalità ma colpisce il DNA aumentandone la frammentazione, inoltre come per il precedente esperimento, l'incubazione a 37°C aumenta la percentuale di spermatozoi vivi con DNA frammentato in accordo con Thijssen il quale non ha riportato differenze di vitalità dopo lunghi tempi di incubazione a temperatura elevata, ma dall'altro lato ha riscontrato un aumento della frammentazione del DNA (Thijssen et al.,2014). Anche Schwarz nel 2012 ha riferito che l'alta temperatura influenza l'integrità del DNA negli spermatozoi selezionati mediante swim up (Schwarz et al.,2012). L'elevata temperatura è, dunque, in grado di influenzare l'integrità genetica anche negli spermatozoi migliori.

Nell'ultimo esperimento della prima parte ho incubato per 3h a 37°C campioni coltivati a diverse concentrazioni spermatiche (RANGE: 1, 100-75; 2, 50-35; 3, 25-15; 4, 10-5 x 10⁶).

In letteratura, dati che riportano una correlazione tra la concentrazione nemaspermica e la produzione di specie reattive dell'ossigeno, sono scarsissimi; i dati presenti riguardano, per lo più, gli effetti delle concentrazioni fisiologiche del paziente e vanno ad indagare le possibili differenze nella qualità spermatica in base alle caratteristiche del paziente stesso. Per questa ragione, mi è sembrato opportuno andare ad indagare se la coltura a differenti concentrazioni spermatiche avesse un effetto deleterio sul seme, in termini di motilità, totale e progressiva, vitalità e frammentazione genomica.

I risultati hanno mostrato che la coltura a diversa concentrazione non influenza la motilità, i parametri cinetici e la vitalità, mentre la frammentazione del DNA e la percentuale di spermatozoi vivi con la frammentazione del DNA aumentano in maniera concentrazione dipendente; questo, probabilmente, perché l'eiaculato umano contiene diversi tipi cellulari compresi leucociti, forme spermatiche immature e spermatozoi amorfi che sono, come ricordiamo, tra le principali fonti di ROS endogene (Tomlinson et al., 1992; Fedder J et al, 1996).

Dai risultati è evidente, quindi, come sia la temperatura che le diverse concentrazioni spermatiche in coltura compromettano l'integrità del DNA senza, necessariamente, influenzare la vitalità spermatica. Questo rappresenta un punto cruciale perché, come già detto, durante le tecniche di riproduzione assistita, in cui vengono bypassati tutti i passaggi di selezione naturale, non siamo in grado di poter discriminare uno spermatozoo con DNA frammentato da uno privo di frammentazione, e ciò può determinare l'insorgenza di complicazioni nello sviluppo embrionale e l'eventuale comparsa di patologie nel nato.

Parte sperimentale II

Nella seconda fase sperimentale sono andata a valutare se il trattamento con degli antiossidanti quali zinco, CoQ10 e D-Asp, presenti nell'integratore Genadis, fosse capace di proteggere gli spermatozoi, anche in presenza di un danno ossidativo esogeno. Da ricerche precedenti, si è visto che altri gruppi di ricerca utilizzavano il sistema X-XO per indurre stress ossidativo a carico degli spermatozoi (Gazo et al., 2015; Shaliutina-Kolesova et al., 2014; Hagedorn et al., 2012; Aitken et al., 1993). Nello specifico, durante il mio periodo di dottorato, sono andata a valutare gli effetti del pretrattamento di diversi campioni di liquido seminale bovino per un'ora con zinco, CoQ10 e D-Asp, inducendo, solo in seguito, lo stress con il sistema X-XO per due ore; questo per valutare se il cocktail di antiossidanti fosse in grado di preservare gli spermatozoi dallo stress esogeno subito in termini di cinetica e frammentazione genomica.

Il modello sperimentale animale utilizzato è stato il bovino grazie alla facile reperibilità, alla disponibilità del materiale biologico ed all'elevato grado di omologia con il meccanismo riproduttivo dell'uomo.

Per quanto riguarda la cinetica dopo 3 ore, si è osservata una drastica diminuzione della motilità totale e progressiva, del campione X-XO rispetto al controllo; contrariamente nel campione Genadis, si è mantenuta la motilità, sia totale che progressiva, con differenze non significative rispetto al controllo; questo dimostra come l'azione degli antiossidanti sia riuscita a proteggere gli spermatozoi dal danno indotto. I parametri cinetici, delle diverse subpopolazioni spermatiche non presentano differenze rilevanti; pur avendo, infatti, i campioni controllo e Genadis la

tendenza ad avere valori cinetici più alti del campione X-XO, il risultato non è stato significativo.

Gli effetti protettivi degli antiossidanti sulla fisiologia di spermatozoi ai quali viene indotto uno stress ossidativo sono stati già studiati precedentemente, tuttavia, la varietà di antiossidanti utilizzati non permette di avere risultati omogenei. Baumber et al., hanno condotto uno studio su spermatozoi equini, il cui obiettivo era di esaminare l'influenza delle ROS, generate attraverso l'uso del sistema X-XO, su motilità, vitalità, integrità acrosomiale, potenziale di membrana mitocondriale e perossidazione di lipidi di membrana; hanno testato diversi antiossidanti (catalasi, superossido dismutasi e glutatione) dimostrando che lo stress ossidativo indotto ha una grande influenza a livello della motilità e che gli antiossidanti, come la catalasi, sono in grado di preservare proprio questo aspetto (Baumber et al., 2000). Ancora, in un recente lavoro su spermatozoi di capra, a cui viene indotto stress mediante X-XO, si è visto che in presenza di antiossidanti vengono preservate sia motilità che i bassi valori iniziali di frammentazione del DNA, al contrario in assenza di antiossidanti gli stessi spermatozoi stressati subiscono un drastico calo della motilità ed un aumento della frammentazione (Gazo et al., 2015).

La frammentazione del DNA in spermatozoi è attualmente un indicatore molto più affidabile della capacità di fecondazione spermatica rispetto ai parametri convenzionali (Wright et al., 2014). Gli antiossidanti svolgono un ruolo protettivo, ma è necessario mantenere un delicato equilibrio tra riduzione ed ossidazione affinché possano attivarsi i diversi meccanismi fisiologici, tra cui la fecondazione.

Come già accennato, durante il mio progetto mi sono occupata anche dello studio degli effetti diretti delle ROS sulla frammentazione del DNA. Ho analizzato, dunque, mediante un saggio Tunel Assay i diversi campioni: controllo a tempo 0; controllo, X-XO e Genadis dopo 3 ore, al fine di valutare se il pretrattamento con gli antiossidanti determinasse una preservazione del grado di frammentazione del DNA. Ho riscontrato, in effetti, da quest'analisi, che, mentre nel campione X-XO il grado di frammentazione di DNA aumenta notevolmente nel tempo, nel campione Genadis non si osservano variazioni significative rispetto al grado di frammentazione di partenza; ho, quindi, dedotto che: l'uso degli antiossidanti tuteli il DNA dai danni indotti dalle ROS, che si sono formate in seguito all'induzione dello stress ossidativo esogeno.

Tuttavia le ROS, durante il processo riproduttivo, esercitano un duplice effetto perché una concentrazione adeguata è essenziale per lo sviluppo embrionale, l'impianto, la difesa del feto contro le infezioni uterine, la steroidogenesi, l'avanzamento della gravidanza ed il parto. D'altra parte, un'incontrollata generazione di ROS, al di là delle difese antiossidanti fisiologiche, può portare al riassorbimento embrionale, alla degenerazione placentare con conseguente alterazione degli scambi materno-fetale, al ritardo nella crescita del feto, all'interruzione della gravidanza, ed in casi più estremi, a nati morti (Mutinati et al., 2013).

Pertanto, nell'ultima fase di questa parte sperimentale, sono andata a valutare, attraverso la fecondazione *in vitro*, se queste diverse subpopolazioni spermatiche avessero la stessa potenzialità di fecondazione e di supportare lo sviluppo embrionale.

I risultati hanno dimostrato che, la competenza di fecondazione del campione X-XO è diminuita, in modo significativo, rispetto al campione controllo, e in modo non significativo rispetto al campione Genadis.

La percentuale di embrioni ad 8 cellule in terza giornata risulta significativamente aumentata nel campione Genadis, indice del fatto che la presenza degli antiossidanti ha giovato allo sviluppo embrionale.

Al giorno 8 sono andata a valutare lo sviluppo embrionale, e ho osservato che la percentuale di blastocisti è significativamente diminuita nel campione X-XO rispetto ai campioni controllo e Genadis, quindi, anche in questo caso, l'azione degli antiossidanti sugli spermatozoi, è stata fondamentale per supportare un avanzamento dello sviluppo embrionale.

In seguito ho indagato la qualità delle blastocisti in termini di numero medio di cellule, e si è osservato che non c'è una differenza significativa tra i campioni ottenuti dalle diverse subpopolazioni spermatiche.

Inoltre, l'altro parametro che ho utilizzato per valutare la qualità embrionale, è stato stimare la percentuale di nuclei apoptotici per blastocisti mediante Tunel Assay. I risultati dimostrano che la percentuale di nuclei apoptotici delle blastocisti del campione X-XO è aumentata in modo altamente significativo rispetto alle blastocisti dei campioni controllo e Genadis, in quest'ultimo, invece, non si osservano variazioni significative rispetto alla percentuale di nuclei apoptotici delle blastocisti del controllo.

Un recente studio del 2015 dimostra che gli spermatozoi trattati con alte concentrazioni di H_2O_2 , e quindi esposti ad un forte stress ossidativo esogeno, influenzano negativamente lo sviluppo embrionale, portando anche ad una

diminuzione dei tassi di blastocisti (De Castro et al.,2015). Inoltre, un lavoro condotto dal gruppo di Yu, ha dimostrato che la quercetina, un antiossidante naturale, presente ad esempio nel vino rosso, promuove sia l'efficiente sviluppo di zigoti allo stadio di blastocisti in presenza di un danno ossidativo indotto da H₂O₂, che la diminuzione del numero di nuclei apoptotici in blastocisti, suggerendo, quindi, che la quercetina ha un effetto protettivo contro lo stress ossidativo preimpianto degli embrioni (Yu S et al., 2014). Uno studio simile è stato condotto utilizzando la crocina, che oltre ad avere un effetto protettivo a livello spermatico determina un significativo aumento del tasso di blastocisti, rispetto al gruppo di controllo. Questi dati indicano che la crocina, quindi, migliora la qualità degli spermatozoi bovini e la loro capacità di fecondazione (Sapanidou et al., 2015).

In definitiva, quindi, l'utilizzo di antiossidanti riesce a prevenire il danno che lo stress ossidativo arreca al DNA degli spermatozoi influenzando positivamente anche lo sviluppo embrionale e la qualità dell'embrione stesso. Gli spermatozoi con il DNA intatto sono in grado di sostenere lo sviluppo di blastocisti di buona qualità. Danni non gravi al DNA spermatico promuovono comunque lo sviluppo di blastocisti, ma con un più alto numero di cellule apoptotiche. Mentre, gli spermatozoi con danni gravi al DNA sono in grado di promuovere la fecondazione e il successivo sviluppo embrionale, ma quest'ultimo ha una forte probabilità di essere arrestato prima di raggiungere lo stadio di blastocisti.

Parte sperimentale III

Nella terza parte sperimentale sono andati a valutare, nel topo, se l'inibizione della via di segnalazione PI3K / PTEN / Akt, attraverso l'utilizzo di un inibitore specifico della serina treonina chinasi Akt a diverse concentrazioni, possa proteggere la riserva

ovarica dai danni del cisplatino. Inibendo la via di segnalazione PI3K / PTEN / Akt si dovrebbe ridurre l'attivazione dei follicoli primordiali indotta dal cisplatino. I follicoli primordiali attivati che non vengono reclutati per completare la loro maturazione, fino a follicoli ovulatori, vanno in atresia riducendo così quel pool di follicoli che rappresenta la riserva ovarica in ogni donna.

Il modello sperimentale animale utilizzato è stato il topo grazie alla facile reperibilità, alla disponibilità del materiale biologico a costi ridotti, all'elevata sovrapposibilità del genoma con quello dell'uomo ed ai ridotti tempi di sviluppo. Nello specifico ho valutato l'effetto del pretrattamento per un'ora con l'inibitore di Akt seguito dal trattamento per 24h con cisplatino su frammenti di ovaio di topi al 4°giorno dopo la nascita, in termini di vitalità follicolare. I risultati hanno mostrato che il pretrattamento con l'inibitore di Akt, a tutte le concentrazioni testate, ha un effetto protettivo contro i danni indotti da cisplatino; nei campioni pretrattati con l'inibitore, infatti, la percentuale di follicoli non atresici era significativamente più alta se confrontata con il campione trattato solo con cisplatino. Il ruolo di Akt e, in generale del pathway PI3K / PTEN / Akt, in letteratura è ben dimostrato, nell'ovaio dei mammiferi questa serina treonina chinasi collabora nella regolazione dello sviluppo follicolare (Cecconi et al.,2012; Makker et al.,2014). Il cisplatino induce l'iper-attivazione dei follicoli primordiali dormienti proprio attraverso l'attivazione della cascata di segnali di Akt. Il risultato di quest'ultima parte sperimentale è in accordo con altri lavori che hanno mostrato come inibendo il pathway PI3K / PTEN / Akt nei segnali a valle si abbia un ritardo nella formazione di follicoli che potrebbe preservare la riserva ovarica (Zhang et al., 2017; Cheaib et al.,2015). Bloccare la cascata di segnali ai primi steps potrebbe essere un'eventuale soluzione per evitare la

perdita massiva di follicoli indotta dai chemioterapici. Già diversi lavori precedentemente hanno dimostrato che l'utilizzo di inibitori delle tirosina chinasi può ridurre l'effetto tossico del cisplatino attraverso l'inibizione di c-Abl responsabile dell'accumulo dell'oncosoppressore P53 (Gonfloni et al., 2009-2010; Livera et al., 2008). L'Imatinib è un farmaco deputato proprio all'inibizione del pathway PI3K / PTEN / Akt, ma è oggetto di svariate critiche poiché in letteratura si trovano dati contrastati circa il fatto che l'Imatinib stesso possa avere effetti deleteri a livello ovarico. Alcuni autori, trovano che esso protegga l'ovaio dai danni indotti da cisplatino senza aver alcun effetto collaterale (Morgan et al., 2013; Maiani et al., 2012; Schultheis et al., 2012); al contrario altri come Kerr et al., trovano che l'Imatinib non abbia alcun effetto protettivo e che sia addirittura responsabile, esso stesso, di alcuni danni (Kerr et al., 2012). Il ruolo del pathway PI3K/PTEN/Akt nel controllo dello sviluppo follicolare e ovocitario ed il suo ruolo nel cancro ovarico sono oramai ampiamente descritti in letteratura (Cecconi et al., 2012; Cheaib et al., 2015). Akt, nello specifico, determina la transizione dei follicoli primodiali dallo stato di quiescenza alla fase di crescita, quindi l'idea di bloccare il pathway PI3K/PTEN/Akt in uno dei suoi steps iniziali potrebbe essere una valida alternativa per preservare la riserva ovarica, impedendo così che l'attivazione non controllata della crescita follicolare da parte del cisplatino riduca in maniera irrimediabile la fertilità femminile. L'utilizzo di una terapia farmacologica che contrasti gli effetti collaterali dei chemioterapici, però non è risparmiata da preoccupazioni di tipo etico, se da un lato sembrerebbe la soluzione ottimale per le pazienti oncologiche che desiderano una maternità, dall'altro lato essa stessa potrebbe essere responsabile di effetti dannosi che

potrebbero presentarsi molto avanti nel tempo; soprattutto in virtù del fatto che Akt, nello specifico, non agisce solo ed esclusivamente a livello ovarico ma ha altre implicazioni relative sempre alla crescita e allo sviluppo cellulare. Per cui sono indispensabili numerosi altri studi per capire se ed in che modo l'utilizzo di farmaci implicati nell'inibizione di pathways di sviluppo possano influenzare la qualità ovocitaria e se, addirittura, possano avere qualche conseguenza durante lo sviluppo embrionale e nei nati per i quali saranno, poi, necessari studi di follow up ben descritti.

Nuove frontiere e le relative implicazioni etiche

La possibilità di manipolare geneticamente gameti e embrioni è diventata, oggi, una realtà. Tutto ciò è consentito, anche, dallo sviluppo del sistema di editing del genoma CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) / Cas9. La possibilità di modificare il genoma delle cellule in modo mirato si basa sul fatto che il DNA è ricco di sequenze ripetute che permettono l'eventuale interazione ed integrazione di frammenti di DNA "esterni", consentendo in questo modo la ricombinazione cellulare (Thomas e Capecchi, 1986; Thomas et al., 1986). L'editing del DNA ha ampiamente successo in diversi tipi di cellule, mentre fino a poco tempo fa è stato praticamente inammissibile nelle cellule germinali e negli embrioni. La possibilità di creare cambiamenti permanenti nel DNA dei gameti e gli embrioni, che saranno ereditati dalle generazioni, suscita nella comunità scientifica diversi atteggiamenti, che vanno da un completo divieto ad una minima approvazione che richiede ulteriori ricerche. I CRISPR sono segmenti di DNA contenenti brevi sequenze ripetute presenti nei procarioti, ogni ripetizione è seguita da brevi

frammenti di DNA distanziatore, lo “spacer”. Le strutture CRISPR sono di estrema importanza poiché associate a loro si trovano complessi di geni chiamati Cas, in grado di codificare per nucleasi ed endonucleasi, enzimi che permettono il “taglio” del DNA. Il sistema CRISPR/Cas è molto usato nell’ingegneria genetica, la sequenza spacer, grazie a RNA guida, riconosce sequenze omologhe sul DNA target e le nucleasi del complesso Cas si occupano di tagliare in quel punto il genoma permettendo di rimuovere, aggiungere o modificare sequenze di geni specifici in molte specie (fig.28)

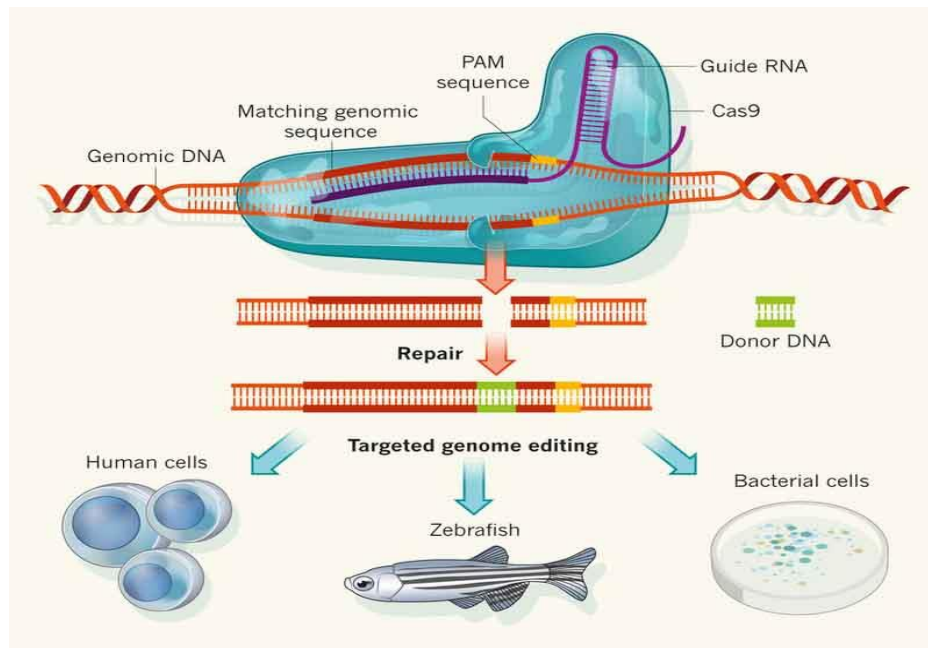


Figura 28: CRISPR/Cas genome editing

Nella linea germinale diversi sono i target per l’editing genomico. Per gli embrioni, il sistema di modifica viene direttamente microiniettato nei pronuclei o nel citoplasma

degli zigoti. L'efficienza dell'editing genomico negli embrioni è bassa, poiché c'è il grande problema della generazione di mosaici embrionali. Nonostante sia bassa, però, è stato dimostrato che, ad esempio, in embrioni di topo può impedire l'insorgenza di disordini genetici come la cataratta mediante l'eliminazione di una sola coppia di basi in un gene specifico (Wu et al., 2013). Recentemente la tecnica di editing CRISPR / Cas9 è stata eseguita anche negli zigoti umani per verificarne la sua efficienza. Da questo lavoro risulta, però, che solo il 5.6% degli zigoti iniettati aveva subito una modifica corretta, nei restati si era verificato o un effetto mosaico o addirittura mutazioni fuori bersaglio; questo ci indica che le correzioni dei geni negli embrioni modificati sono ancora estremamente imprecise (Liang et al., 2015). Come possibile alternativa all'approccio zigotico le modifiche genetiche potrebbero anche essere applicate durante la gametogenesi. Applicando il sistema CRISPR / Cas9 in ovociti o spermatozoi immaturi si potrebbero generare ovociti e spermatozoi maturi e geneticamente corretti che potrebbero essere successivamente utilizzati per una ART. La correzione delle mutazioni nella linea germinale potrebbe consentire di avere spermatozoi o ovociti privi di mutazioni che di conseguenza produrrebbero embrioni e bambini sani e non portatori modificando, così, anche la frequenza della mutazione stessa nella popolazione. L'uso di CRISPR / Cas9 diventa utile in circostanze eccezionali come il caso di coppie nelle quali entrambi i partner sono affetti dalla stessa malattia monogenica, o ancora per pazienti che sono omozigoti dominanti per una patologia autosomica come la corea di Huntington.

Oltre al potenziale utilizzo clinico, la modifica del genoma grazie a CRISPR /Cas9 è uno strumento straordinario nell'ambito della ricerca sullo sviluppo umano e

animale, poiché alterando i geni implicati nello sviluppo si possono capire le loro funzioni.

Limitandosi al campo della biologia della riproduzione, possiamo distinguere tre categorie di vantaggi: maggiore conoscenza e comprensione dei processi di sviluppo e del funzionamento dei geni che possono contribuire a migliorare le tecnologie mediche, correzione di difetti che causano infertilità nei genitori, correzione delle malattie nei futuri bambini (Sugarman, 2015).

Il fatto, però, che l'editing in questo campo implichi la manipolazione della linea germinale e degli embrioni solleva forti questioni etiche; in molti paesi questi processi sono proibiti (Araki and

Ishii, 2014). Insieme all'obiezione della modifica della linea germinale ci sono altri aspetti di minore importanza che fanno discutere, come ad esempio il fatto che queste modifiche siano fatte senza il consenso delle generazioni future (Collins, 2015); tuttavia lo stesso concepimento avviene senza il consenso del bambino nato.

Quello che più preoccupa, paradossalmente, è che l'applicazione della manipolazione genetica per la riproduzione, seppur a fini terapeutici, può avere effetto sulla salute dal bambino allo stesso modo delle manipolazioni necessarie durante una ART. “I risultati di tali esperimenti non sono suscettibili di una valutazione a lungo termine in una scala temporale scientificamente ragionevole” (Friedmann et al., 2015).

Altro aspetto che desta preoccupazioni è che la modifica genetica indurrebbe la modifica del genoma umano e così cambierebbe la specie stessa, tutto ciò richiederebbe applicazioni su larga scala, che per quanto improbabile non è impossibile; sarebbe una vera e propria minaccia alla dignità umana e una fonte di

preoccupazione per il rinnovo dell'eugenetica (Comitato internazionale di bioetica dell'UNESCO, 2015).

La valutazione finale delle tecniche di editing genetico per evitare le malattie nella prole dipende anche dal confronto con altre tecniche come la donazione di gameti e la PGD (diagnosi genetica pre-impianto); secondo alcuni, esistono poche applicazioni mediche che giustificano la modifica dei geni degli embrioni, proprio a causa dell'esistenza di alternative (Collins, 2015; Lanphier et al., 2015). La questione cruciale diventa il valore attribuito alla genitorialità genetica.

Oltre alle malattie genetiche, migliaia di madri ogni anno rischiano di trasmettere le loro malattie mitocondriali che nella forma più grave sono fatali. Senza alcuna cura, la prevenzione delle trasmissioni è l'unica speranza attuale per ridurre l'incidenza di malattie. Il mtDNA è ereditato esclusivamente dalla mamma; le varie mutazioni del mtDNA provocano disfunzioni che possono avere gravi conseguenze per i tessuti e organi come il cervello, il cuore, il muscolo e il sistema nervoso centrale e spesso la disfunzione mitocondriale si manifesta come malattia multi-organo. Una speranza nella cura di tali patologie è la terapia genica con CRISPR /Cas9 o la terapia mitocondriale sostitutiva (MRT mtDNA replacement therapy) (Flogeman S et al., 2016). Anche quest'ultimo metodo è oggetto di molte preoccupazioni etiche a causa dell'utilizzo di un embrione donatore per il trapianto del DNA nucleare del paziente; tuttavia, è stato approvato nel Regno Unito ed è stato recentemente dichiarato eticamente ammissibile dalla FDA. La PGD da informazioni circa il DNA mitocondriale ma non offre possibilità di intervento se questo è mutato.

La terapia sostitutiva mitocondriale usa un ovocita o un embrione donatore enucleato a cui vengono trasferiti lo spindle-chromosome complex (MII-SCC fuso meiotico di

un ovocita in MII), i pronuclei dei genitori o la vescicola germinativa, così da prevenire la trasmissione delle malattie mitocondriali delle cellule parentali, nel caso venga trasferito lo spindle-chromosome complex l'ovocita donatore dovrà poi essere fecondato mediante una IVF (fig.29).

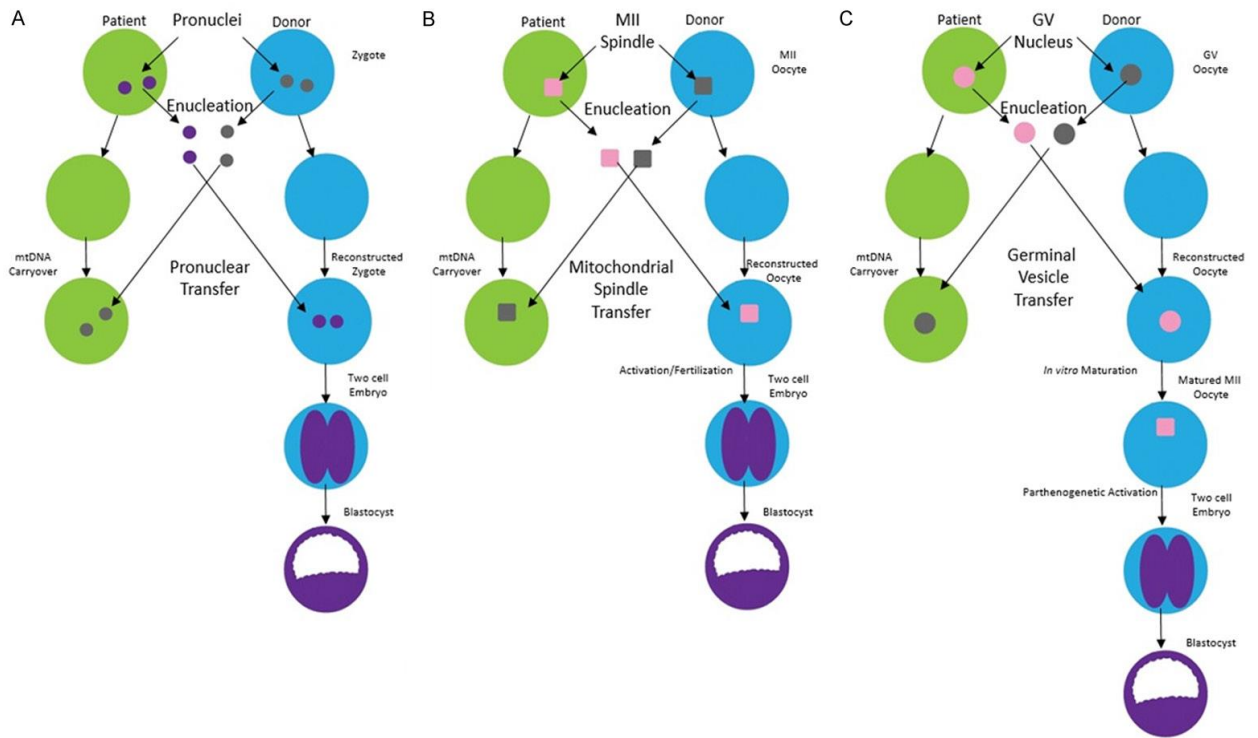


Figura 29: metodi di trasferimento per MRT

Al fine di diagnosticare la malattia mitocondriale, è necessaria una storia familiare molto dettagliata per cercare indizi che dimostrano una linea materna di eredità (Chinnery PF et al.,1998). A causa della variabilità di espressione delle malattie mitocondriali, può non essere sempre evidente che una donna è effettivamente portatrice di una mutazione di mtDNA. I progressi nella ricerca e nella medicina negli ultimi decenni hanno consentito di chiarire la completa sequenza di mtDNA umano (Lieber DS et al., 2013). I test genetici per le mutazioni più comuni nel

mtDNA sono ora ampiamente disponibili nei laboratori diagnostici e un semplice test di sangue può rivelare le mutazioni più comuni associate alle più comuni sindromi cliniche. Data la mancanza di trattamenti curativi per le malattie mitocondriali e le limitazioni della consulenza genetica e delle diagnosi prenatali, la ricerca si è concentrata sulla prevenzione della trasmissione del DNA mitocondriale mutato.

Per quanto riguarda l'efficacia del trattamento un recente studio di Wang et al. ha dimostrato che l'MRT ha consentito lo sviluppo normale della progenie che aveva un peso paragonabile al gruppo controllo (Wang et al.,2014). Un altro studio di Neupane et al. ha prodotto risultati simili per quanto riguarda il potenziale di sviluppo dimostrando che lo sviluppo embrionale fino alla fase di blastocisti è stato quasi identico sia nel trasferimento di MII-SCC che di pronuclei e la qualità della blastocisti stessa è paragonabile ai controlli (Neupane et al.,2014).

Così come il sistema CRISPR/Cas anche l'MRT solleva forti questioni etiche prima fra tutte la questione della tri-genitorialità che si pone anche per i bambini nati da madri surrogato o grazie a donatrici di uova. Il DNA mitocondriale codifica solo per lo 0.1% dei geni totali per cui sembra quasi eccessivo parlare di tri-genitorialità. I donatori di citoplasma sono considerati donatori di organi e i ricercatori etici hanno concluso che la donazione mitocondriale "non indica, né biologicamente né legalmente, alcuna nozione di figlio avente un terzo genitore o una seconda madre"(Cohen J and Alikani M 2013). Inoltre, proprio come i donatori di organi non hanno alcuna pretesa sugli organi donati, i donatori del citoplasma non hanno alcuna pretesa sugli organi donati e per estensione su tutti i bambini che ricevono tali organelli.

Altra grande questione, è che anche in questo tipo di trattamento le conseguenze a lungo termine in offspring sono sconosciute e destano timori per la salute dei nati. Metodi appropriati di ricerca e linee guida rigorose possono affrontare queste questioni così da poter permettere la formazione di famiglie più sane e felici.

Nell'ambito delle manipolazioni, in particolare durante una ART, la ricerca sperimentale ha un importante ruolo nell'identificare i fattori che possono indurre un danno a gameti ed embrioni e nell'individuare modifiche in tali trattamenti che possano tutelare la salute dei gameti, embrioni e quindi dei nati da ART. Alla base di tutto questo, in definitiva, potrebbe esserci sia la sofferenza embrionale e fetale causata dall'eccessiva manipolazione, sia l'esistenza di qualche fattore, che durante ogni fase diversa del processo di fecondazione *in vitro*, influenza lo sviluppo dell'embrione e viene "ricordato" anche dal feto, e quindi dall'individuo adulto.

L'obiettivo comune che tutte le società riproduttive dovrebbero perseguire è valutare l'adeguatezza genitoriale senza pregiudizi tenendo a mente il benessere ed il futuro del nuovo nato. La formazione di una famiglia comprensiva di figli è un diritto umano, che dovrebbe essere soddisfatto se lo si desidera.

Possiamo concludere che, un intervento appropriato può essere attuato in varie fasi durante le procedure ART per minimizzare gli effetti dannosi dello stress ossidativo. Tali accorgimenti potrebbero essere: l'utilizzo di una concentrazione spermatica inferiore, periodi più brevi di incubazione, l'impiego di adeguate tecniche di preparazione spermatica, l'uso di bassi livelli di illuminazione e, l'impiego di mezzi di coltura adeguati. Eventuali miglioramenti durante la manipolazione *in vitro* del seme umano, potrebbero ridurre al minimo gli effetti negativi dei danni, che

colpiscono in particolar modo il DNA, e che si ripercuotono sull'embrione accompagnandolo poi per il resto della vita.

BIBLIOGRAFIA

Agarwal A, Allamaneni SS. *Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction*. *Reprod Biomed Online*. 2004 Sep;9(3):338-47

Agarwal A, Damayanthi D and du Plessis SS. *Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review*. *Ashok Reproductive Biology and Endocrinology* 2014 Nov 24;12: 112

Agarwal A, Gupta S, Abdel-Razek H, Krajcir N, Athayde K. *Impact of oxidative stress on gametes and embryos in an ART Laboratory*. *Clin Embryologist* 2006 Volume 9, Issue 3

Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. *Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis*. *Reprod Biomed Online* 2006 May;12(5):630-3

Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. *Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting*. *Fertil Steril* 2006 Sep;86(3):503-12

Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. *Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction.* Fertil Steril 2003 Apr;79(4):829-43

Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. *Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria.* Hum Reprod. 2010 Oct;25(10):2415-26

Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S. *Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine.* Mol Reprod Dev 1997 Aug;47(4):468-82

Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. *A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation.* J Cell Sci. 1998 Mar;111 (Pt 5):645-56

Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. *Oxidative stress and male reproductive health.* Asian J Androl. 2014 Jan-Feb;16(1):31-8

Ayea ILMH, Rosario FJ, Powell TL, and Jansson T. *Adiponectin supplementation in pregnant mice prevents the adverse effects of maternal obesity on placental function and fetal growth.* Physiology. 2015 Oct 13;112(41):12858-63

Araki M, Ishii T. *International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization*. *Reprod Biol Endocrinol* 2014 Nov 24;12:108

Baker TG. *A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963 Oct 22; 158:417-33

Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. *Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa*. *Reproduction* 2005 Apr;129(4):505-14

Batt PA, Gardner DK, Cameron AW. *Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1991 3(5):601-7

Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. *The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation*. *Journal of Andrology* 2000 Nov-Dec;21(6):895-902

Beauchamp TL, Childress JF. *Principles of biomedical ethics*. 5th ed. Oxford University Press 2001

Belous AM, Bondarenko VA. *Structural Changes of Biological Membranes During Cooling*. Naukova Dumka, 1982

Berthelot F, Terqui M. *Effects of oxygen, CO₂/pH and medium on the in vitro development of individually cultured porcine one- and two-cell embryos*. *Reprod Nutr Dev* 1996 36(3):241-51

Biggers JD, McGinnis LK, and Raffin M. *Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium*. *Biology of Reproduction* 2000 Jul;63(1):281-93

Bishop DW. *Active secretion in the rabbit oviduct*. *Am J Physiol*. 1956 Nov;187(2):347-52

Blatt J. *Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer*. *Med Pediatr Oncol*. 1999 Jul;33(1):29-33

Bontekoe S, Mantikou E, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. *Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies*. *Cochrane Database Syst Rev* 2012 Jul 11;(7):CD008950

Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni L and Coticchio G. *Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART*. *Human Reproduction* 2006 Nov;21(11):2876-81

Braannstroom M, Johannesson L, Bokstroom H. *Live birth after uterus transplantation*. Lancet 2015 Aug;106(2):261-6

Bronet F, Nogales M-C, Martinez E, Ariza M, Rubio C, Garcia-Velasco J-A, Meseguer M. *Is there a relationship between time-lapse parameters and embryo sex?* Fertil Steril 2015 Feb;103(2):396-401

Bunge RG, Sherman JK. *Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa*. Nature 1953 Oct 24;172(4382):767-8

Calamera JC, Fernandez PJ, Buffone MG, Acosta AA, Doncel GF. *Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect*. Andrologia 2001 Mar;33(2):79-86

Carlsen E, Andersson AM, Petersen JH, Skakkebaek NE. *History of febrile illness and variation in semen quality*. Hum Reprod. 2003 Oct;18(10):2089-92

Carolan-Olah M, Duarte-Gardea M, Lechuga J. *A critical review: early life nutrition and prenatal programming for adult disease*. J Clin Nurs 2015 Dec;24(23-24):3716-29

Cecconi S, Mauro A, Cellini V, Patacchiola F. *The role of Akt signalling in the mammalian ovary*. Int J Dev Biol. 2012;56(10-12):809-17

Centers for Disease Control and Prevention ASfRM, Society for Assisted Reproductive Technology 2012

Centri per il Controllo e la Prevenzione delle malattie, 2012

Chang EM, Lim E, Yoon S, Jeong K, Bae S, Lee DR, Yoon TK, Choi Y, Lee WS. *Cisplatin Induces Overactivation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/AKT/FOXO3a Pathway which Leads to Loss of Ovarian Reserve in Mice.* PLoS One. 2015 Dec 4;10(12): e0144245

Cheab B, Auguste A, Leary A. *The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges.* Chinese Journal of Cancer 2015 Jan;34(1):4-16

Chemes EH, Rawe YV. *Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men.* Hum Reprod Update. 2003 Sep-Oct;9(5):405-28

Chen AA, Tan L, Suraj V, Reijo Pera R, Shen S. *Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application.* Fertil Steril 2013 Mar 15;99(4):1035-43

Chen C. *Pregnancy after human oocyte cryopreservation*. Lancet 1986 Apr 19;1(8486):884-6

Chen S, Sun F, Huang X, Wang X, Tang N, Zhu B & Li B. *Assisted reproduction causes placental maldevelopment and dysfunction linked to reduced fetal weight in mice*. Scientific reports 2015 Jun 18;5:10596

Chinnery PF, Howell N, Lightowers RN and Turnbull DM. MELAS and MERRF. *The relationship between maternal mutation load and the frequency of clinically affected offspring*. Brain 1998 Oct;121 (Pt 10):1889-94

Christova Y, James PS, Jones R. *Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals*. Mol Reprod Dev 2004 Jul;68(3):365-72

Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. *Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis*. Int Braz J Urol. 2007 Sep-Oct;33(5):603-21

Cohen J and Alikani M. *The biological basis for defining bi-parental or tri-parental origin of offspring from cytoplasmic and spindle transfer*. Reprod Biomed Online 2013 Jun;26(6):535-7

Collins FS. *Statement on NIH funding of research using gene-editing technologies in human embryos*. National Institutes of Health 2015

Comitato internazionale di bioetica dell'UNESCO, 2015

Contu L. and Hawkes CA. *A Review of the Impact of Maternal Obesity on the Cognitive Function and Mental Health of the Offspring*. International Journal of molecular Sciences 2017 May 19;18(5). pii: E1093

Cooke MS, Evans MD, Herbert KE, Lunec J. *Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine-source, significance and supplements*. Free Radic Res 2000 May;32(5):381-97

Craig MA, Shauna AH, Murphy EM, Cromie AR, Lonergan P and Fair S. *The impact of storage temperature and sperm number on the fertility of liquid-stored bull semen*. Reproduction, Fertility and Development 2015 Mar 5

Dada R, Gupta NP, Kucheria K. *Spermatogenic arrest in men with testicular hyperthermia*. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis. 2003 Suppl 1:235-43

Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE. *Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm*. Fertil Steril 2004 Nov;82(5):1443-5

De Castro L, de Assis PM, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CM, Losano JDA, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOA. *Sperm Oxidative Stress Is Detrimental to Embryo Development: A Dose-Dependent Study Model and a New and More Sensitive Oxidative Status Evaluation*. *Oxid Med Cell Longev* 2015 2016:8213071

De Silva M. *Effect of storage of Ham's F-10 medium on one-cell mouse embryo development in vitro*. *J Assist Reprod Genet* 1993 Apr;10(3):238-41

Demeestere I, Simon P, Buxant F, Robin V, Fernandez SA, Centner J, et al. *Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report*. *Hum Reprod* 2006 Aug;21(8):2010-4

Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. *Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation*. *Human Reproduction Update*. 2009 Nov-Dec;15(6):649-65

Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. *Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART*. *Adv Urol* 2012 2012:854837

Dickey RP, Xiong X, Klempel MC, Pridjian G. *Singleton birth weight by gestational age following in vitro fertilization in the United States*. American Journal of Obstetrics and Gynecology 2015 Jan;214(1): 101.e1-101.e13

Donnez J, Madrid BM, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D and Dolmans MM. *Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review*. Hum Reprod Update. 2006 Sep-Oct;12(5):519-35. Epub Jul 18

du Plessis SS, Makker K, Desai NR, Agarwal A. *Impact of oxidative stress on IVF*. Expert Rev Obstet Gynecol 2008 3(4),539-554

Dumoulin JM, Coonen E, Bras M, Bergers-Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen RC, van Wissen LC, Geraedts JP, Evers JL. *Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure*. Hum Reprod 2001 Feb;16(2):306-12

Dumoulin JC, Land JA, Van Montfoort AP, Nelissen EC, Coonen E., Derhaag JG, Schreurs IL, Dunselman GA, Kester AD, Geraedts JP et al. *Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns*. Hum Reprod 2010 Mar;25(3):605-12

Dunford AR, Sangster JM. *Maternal and paternal periconceptional nutrition as an indicator of offspring metabolic syndrome risk in later life through epigenetic imprinting*. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews 2017 May 10. pii: S1871-4021(17)30109-1

Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK. *Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids*. Mol Reprod Dev 1998 Aug;50(4):434-42

Elshal MF, El-Sayed IH, Elsaied MA, El-Masry SA, Kumosani TA. *Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking*. Clin Biochem. 2009 May;42(7-8):589-94

Esfandiari N, Falcone T, Agarwal A, Attaran M, Nelson DR, Sharma RK: *Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse embryos*. Obstet Gynecol 2005 Mar;105(3):653-60

Eskild A, Monkerud L, Tanbo T. *Birthweight and placental weight; do changes in culture media used for IVF matter? Comparisons with spontaneous pregnancies in the corresponding time periods*. Hum Reprod 2013 Dec;28(12):3207-14

Faddy MJ, Gosden RG. *A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women*. Hum Reprod 1996 Jul;11(7):1484-6

Fauque P, Mondon F, Letourneur F. et al. *In vitro fertilization and embryo culture strongly impact the placental transcriptome in the mouse model*. PLoS ONE 2010 Feb 15;5(2):e9218

Fedder J. *Nonsperm cells in human semen: with special reference to seminal leukocytes and their possible influence on fertility.* Arch Androl. 1996 Jan-Feb;36(1):41-65

Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. *Early life nutrition and metabolic programming.* Ann N Y Acad Sci 2010 Volume 1212 Pages 78–96

Fischer B, Bavister BD. *Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits.* J Reprod Fertil 1993 Nov;99(2):673-9

Fogleman S, Santana C, Bishop C, Miller A, Capco DG. *CRISPR/Cas9 and mitochondrial gene replacement therapy: promising techniques and ethical considerations.* Am J Stem Cells 2016 Aug 20;5(2):39-52

Friedmann T, Jonlin EC, King NM, Torbett BE, Wivel NA, Kaneda Y, Sadelain M. *ASGCT and JSGT joint position statement on human genomic editing.* Mol Ther 2015 Aug;23(8):1282

Gallup GG. *On the origin of descended scrotal testicles: the activation hypothesis.* Evol. Psychol. 2009 7(4): 517-526

Gamal I, Serour, MD, Ahmed G, Serour, MD. *Ethical issues in infertility* Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 2017 Volume 43, August,Pages 21-31

Gamzatova Z, Komlichenko E, Kostareva A, Galagudza M, Ulrikh E, Zubareva T, Sheveleva T, Nezhentseva E, Kalinina E. *Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue—effective method of fertility preservation in cancer patients.* Gynecological Endocrinology. 2014 30(Suppl 1):43–47

Gardner DK, Hamilton R, McCallie B, Schoolcraft WB, and. Katz-Jaffe MG. *Human and mouse embryonic development, metabolism and gene expression are altered by an ammonium gradient in vitro.* Reproduction 2013 Jun 14;146(1):49-61

Gardner DK, Kelley RL. *Male and female embryos differ in their response to oxygen concentration.* Fertil Steril 2013

Gardner DK, Lane M. *Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture.* Biol Reprod 1993 Feb;48(2):377-85

Gardner DK, Lane M. *Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting.* Reprod Fertil Dev 2005 17(3):361-70

Gardner DK, Wale PL, Collins R, Lane M. *Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome*. Hum Reprod 2011 Aug;26(8):1981-6

Gazo I, Shaliutina-Kolešová A, Dietrich MA, Linhartová P, Shaliutina O, Cosson J. *The effect of reactive oxygen species on motility parameters, DNA integrity, tyrosine phosphorylation and phosphatase activity of common carp (Cyprinus carpio L.) spermatozoa*. Mol Reprod 2015 Jan;82(1):48-57

Gluckman PD, Hanson MA. *Maternal constraint of fetal growth and its consequences*. Semin Fetal Neonatal Med. 2004 Oct;9(5):419-25

Gonfloni S, Di Tella L, Caldarola S, Cannata SM, Klinger FG, Di Bartolomeo C, Mattei M, Candi E, De Felici M, Melino G, Cesareni G. *Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death*. Nat Med. 2009 Oct;15(10):1179-85

Gonfloni S, Tella LD, Caldarola S, Cannata SM, Klinger FG, et al. *Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy induced death*. Nat Med 2009 15: 1179–1185

Gonfloni S. *DNA damage stress response in germ cells: role of c-Abl and clinical implications*. Oncogene 2010 29: 6193–6202

Gott AL, Hardy K, Winston RM, Leese HJ. *Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos*. Hum Reprod 1990 Jan;5(1):104-8

Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R. *Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status*. Fertil Steril 2009 Apr;91(4):1023-34

Gualtieri R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Rizos D, Longobardi S, Talevi R. *Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development*. Theriogenology 2014 Sep 1;82(4):592-8

Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. *Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings*. Hum Reprod Update 2001 Mar-Apr;7(2):175-89

Guimarães ACG, Leivas FG, Santos FW, Schwengber EB, Giotto AB, Machado CIU, Goncalves CGM, Folchini NP, Brum DS. *Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery*. Animal Reproduction Science 2014 May;146(3-4):103-10

Guoyao Wu, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, and Spencer TE. *Maternal Nutrition and Fetal Development*. The Journal of Nutrition 2004 vol. 134 no. 9 2169-2172

Gupta S, Malhotra N, Sharma D, Chandra A, Agarwal A. *Oxidative stress and its role in female infertility and assisted reproduction: clinical implications*. Int J Fertil Steril 2009 Vol.2 Num 4, Feb-Mar, Pages 147-154

Hagedorn M, McCarthy M, Carter VL, Meyers SA. *Oxidative stress in zebrafish (Danio rerio) sperm*. PLoS One 2012 7(6): e39397

Hammadeh ME, Strehler E, Zeginiadou T, Rosenbaum P, Schmidt W. *Chromatin decondensation of human sperm in vitro and its relation to fertilization rate after ICSI*. Arch Androl 2001 Apr-Jun;47(2):83-7

Harrison R, Weiner J. *Abdomino-testicular temperature gradients*. J Physiol 1948 18:256–262

Hassani F, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Rezazadeh Valojerdi M, Movaghar B, Fazel M, Fouladi HR, Shabani F, Johansson L. *The effects of ISM1 medium on embryo quality and outcomes of IVF/ICSI cycles*. Int J Fertil Steril 2013 Jul;7(2):108-15

Helppi J, Schreier D, Naumann R, Zierau O. *Mouse reproductive fitness is maintained up to an ambient temperature of 28°C when housed in individually-ventilated cages.* Lab anim. 2016 Aug;50(4):254-63

Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, Keirse MJ. *Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies.* BMJ 2004 Jan 31;328(7434):261

Henkel RR, Schill WB. *Sperm preparation for ART.* Reprod Biol Endocrinol 2003 1:108

Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE, Lavin C, Chu S, Dadras S, Reddy JK, White JG. *Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells.* Proc Natl Acad Sci U S A 1999 May 25;96(11):6255-60

Howell SJ, Shalet SM. *Testicular function following chemotherapy.* Hum Reprod Update 2001 Jul-Aug;7(4):363-9

Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. *Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions.* Hum Reprod 2003 Aug;18(8):1660-5

Hossain A, Osuamkpe C, Hossain S, Phelps J. *Shelf life of embryo culture media: buffering potential of media apparently not the determining factor*. Middle East Fertil Soc J 2010 Volume 15, Issue 3 Pages 179-182

Huang Z, Wells D. *The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome*. Mol Hum Reprod 2010 Oct;16(10):715-25

Imrat P, Mahasawangkul S, Gosálvez J, Suthanmapinanth P, Sombutputorn P, Jansittiwate S, Thongtip N, Pinyopummin A, Colenbrander B, Holt WV, Stout TA. *Effect of cooled storage on quality and DNA integrity of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa*. Reprod Fertil 2012; 24(8):1105-16

Istituto Superiore di Sanità 2015

Ivell R. *Lifestyle impact and the biology of the human scrotum*. Reprod Biol Endocrinol 2007 Apr 20; 5:15

Isachenko V, Isachenko E, Weiss JM. *Human ovarian tissue: vitrification versus conventional freezing*. Human Reproduction. 2009. Aug;138(2):319-27

Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS. *Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis*. Obstet Gynecol, 2004 Mar;103(3):551-63

Jahan-Mihan A., Rodriguez J., Christie C., Sadeghi M., Zerbe T. *The Role of maternal dietary proteins in development of metabolic syndrome in offspring.* Nutrients 2015 Nov 6;7(11):9185-217

Janecka M, Rijdsdijk F, Rai D, Modabbernia A and Reichenberg A. *Advantageous developmental outcomes of advancing paternal age.* Transl Psychiatry 2017 Jun 20;7(6): e1156

Jans G, Matthys C, Bogaerts A, Lannoo M, Verhaeghe J, Van der Schueren B, Devlieger R. *Maternal Micronutrient Deficiencies and Related Adverse Neonatal Outcomes after Bariatric Surgery: A Systematic Review.* Adv Nutr. 2015 Jul 15;6(4):420-9

Jansson N, Rosario FJ, Gaccioli F, Lager S, Jones HN, Roos S, Jansson T, Powell TL. *Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies.* J Clin Endocrinol Metab. 2013 Jan;98(1):105-13

Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P, Andersen CY. *86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children.* J Assist Reprod Genet. 2017 Mar;34(3):325-336

Jeruss JS, Woodruff TK. *Preservation of fertility in patients with cancer.* N Engl J Med 2009 Feb 26;360(9):902-11

Jin J, Jin N, Zheng H, Ro S, Tafolla D, Sanders KM, Yan W. *Catsper3 and Catsper4 are essential for sperm hyperactivated motility and male fertility in the mouse*. Biol Reprod 2007 Jul;77(1):37-44

Jones R, Mann T, Sherins RJ. *Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma*. Fertil Steril 1979 May;31(5):531-7

Juretzka MM, O'Hanlan KA, Katz SL, El-Danasouri I, Westphal LM. *Embryo cryopreservation after diagnosis of stage IIB endometrial cancer and subsequent pregnancy in a gestational carrier*. Fertil Steril. 2005 Apr;83(4):1041

Khalili MA, Maione M, Palmerini MG, Bianchi S, Macchiarelli G, Nottola SA. *Ultrastructure of human mature oocytes after vitrification*. European Journal of Histochemistry 2012 Aug 10;56(3): e38

Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahceci M. *Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes*. Reprod Biomed Online 2004 Oct;9(4):409-17

Kerr JB, Hutt KJ, Cook M, Speed TP, Strasser A, et al. *Cisplatin-induced primordial follicle oocyte killing and loss of fertility are not prevented by imatinib*. Nat Med 2012 18: 1170–1172

Khosla S, Dean W, Reik W, and Feil R. *Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype*. Human Reproduction 2001 Jul-Aug;7(4):419-27

Kim SY, Kim SK, Lee JR, Woodruff TK. *Toward precision medicine for preserving fertility in cancer patients: existing and emerging fertility preservation options for women*. J Gynecol Oncol. 2016 Mar;27(2): e22

Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. *Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring*. Fertil Steril 2013 Mar 1;99(3):738-744.e4

Kleijkers SH, Eijssen LM, Coonen E et al. *Differences in gene expression profiles between human preimplantation embryos cultured in two different IVF culture media*. Human Reproduction 2015 Oct;30(10):2303-11

Kleijkers SHM, van Montfoort APA, Smits LJM et al. *IVF culture medium affects post-natal weight in humans during the first 2 years of life*. Human Reproduction 2014 Apr;29(4):661-9

Kleijkers SHM, van Montfoort APA, Smits LJM, Coonen E, Derhaag JG, Evers JLH, and Dumoulin JCM. *Age of G-1 PLUS v5 embryo culture medium is inversely associated with birthweight of the newborn.* Human Reproduction 2015 Jun;30(6):1352-7

Knox RV, Ringwelski JM, McNamara KA, Aardsma M, Bojko M. *The effect of extender, method of thawing, and duration of storage on in vitro fertility measures of frozen-thawed boar sperm.* Theriogenology 2015 Aug;84(3):407-12

Kumar M, Kumar K, Jain S, Hassan T, Dada R. *Novel insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo.* Clinics 2012 68 Suppl 1:5-14

Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. *Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension.* Development 2000 Oct;127(19):4195-202

Lachaud C, Tesarik J, Canadas ML, Mendoza C. *Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa.* Hum Reprod. 2004 Mar;19(3):607-10

Lampiao F, Strijdom H, Du Plessis SS. *Effects of sperm processing techniques involving centrifugation on nitric oxide, reactive oxygen species generation and sperm function.* Open Androl J 2010 2, 1-5

Lampiao F. *Free radicals generation in an in vitro fertilization setting and how to minimize them.* World J Obstet Gynecol. 2012. 1(3): 29-34

Lane M and Gardner DK. *Embryo culture medium: which is the best?* Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology 2007 Volume 21, Issue 1, Feb, Pages 83-100

Lane M, Gardner DK. *Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse.* Biol Reprod 2003 Oct;69(4):1109-17

Langley-Evans S. *Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review.* J Hum Nutr Diet 2015 Jan;28 Suppl 1:1-14

Lanphier E, Urnov F, Haecker SE, Werner M, Smolenski J. *Don't edit the human germ line.* Nature 2015 Mar 26;519(7544):410-1

Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, et al. *American society of clinical oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients.* J Clin Oncol 2006. Jun 20;24(18):2917-31

Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC. *Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing.* Exp Cell Res 1974 Nov;89(1):79-88

Li R, Liu Y, Pedersen HS, Callesen H. *Effect of ambient light exposure of media and embryos on development and quality of porcine parthenogenetically activated embryos.* Zygote 2015 Jun;23(3):378-83

Li W, Goossens K, Van Poucke M, Forier K, Braeckmans K, Van Soom A, LJ Peelman. *High oxygen tension increases global methylation in bovine 4-cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression.* Reprod Fertil Dev 2016 Jun;28(7):948-959

Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y et al. *CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes.* Protein Cell 2015 May;6(5):363-372

Lieber DS, Calvo SE, Shanahan K, Slate NG, Liu S, Hershman SG, Gold NB, Chapman BA, Thorburn DR, Berry GT, Schmahmann JD, Borowsky ML, Mueller DM, Sims KB and Mootha VK. *Targeted exome sequencing of suspected mitochondrial disorders.* Neurology 2013 May 7;80(19):1762-70

Livera G, Petre-Lazar B, Guerquin MJ, Trautmann E, Coffigny H, et al. *p63 null mutation protects mouse oocytes from radio-induced apoptosis.* Reprod 2008 135: 3–12. 50

Lovelock JE. *The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing.* Biochim Biophys Acta 1953 May;11(1):28-36

Lue YH, Lasley BL, Laughlin LS, Swerdloff RS, Hikim AP, Leung A. *Mild testicular hyperthermia induces profound transitional spermatogenic suppression through increased germ cell apoptosis in adult cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)*. Journal of Andrology 2002 Nov-Dec;23(6):799-805

Maiani E, Di Bartolomeo C, Klinger FG, Cannata SM, Bernardini S, et al. *Reply to: Cisplatin-induced primordial follicle oocyte killing and loss of fertility are not prevented by imatinib*. Nat Med 2012 18: 1172–1174

Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, et al. *Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes*. Hum Reprod 1998 13 Suppl 3:161-74

Mann MRW, Lee SS, Doherty AS et al. *Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture*. Development 2004 Aug;131(15):3727-35

Mamsen LS, Lutterodt MC, Andersen EW, Byskov AG, Andersen CY. *Germ cell numbers in human embryonic and fetal gonads during the first two trimesters of pregnancy: analysis of six published studies*. Hum Reprod 2011 Aug;26(8):2140-5

Marchesi DE, Biederman H, Ferrara S, Hershlag A, Feng HL. *The effect of semen processing on sperm DNA integrity: comparison of two techniques using the novel*

Toluidine Blue Assay. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2010 Aug;151(2):176-80

Mastroianni L Jr, Jones R. *Oxygen tension within the rabbit fallopian tube*. J Reprod Fertil 1965 Feb; 9:99-102

Matsuura R, Takeuchi T, and Yoshida A. *Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa*. Asian Journal of Andrology 2010 Sep;12(5):753-9

Mazur P. *Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing*. J Gen Physiol 1963 Nov 47:347-69

McEvoy TG, Robinson JJ, Ashworth CJ, Rooke JA, Sinclair KD. *Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development*. Theriogenology 2001 Jan 1;55(1):113-29

McLaren JF. *Infertility evaluation*. Obstet Gynecol Clin North Am 2012 Volume 39, Issue 4, Dec, Pages 453-463

McLaren JF, Bates GW. *Fertility preservation in women of reproductive age with cancer*. Am J Obstet Gynecol 2012 Dec;207(6):455-62

MacLeod J, Hotchkiss RS. *The effect of hyperpyrexia upon spermatozoa counts in men*. Endocrinology 1941 Volume 28, Issue 5, 1 May, Pages 780–784

Meuter A, Rogmann L-M, Winterhoff B, Tchkonja T, Kirkland J, Morbeck D. *Markers of cellular senescence are elevated in murine blastocysts cultured in vitro: molecular consequences of culture in atmospheric oxygen*. J Assist Reprod Genet 2014 Oct;31(10):1259-67

Mieusset R, Bujan L, Mondinat C, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. *Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men*. Fertil Steril 1987 Dec;48(6):1006-11

Mieusset R, Bengoudifa B, Bujan L. *Effect of posture and clothing on scrotal temperature in fertile men*. J Androl 2007 Jan-Feb;28(1):170-5. Epub 2006 Sep 6

Morales ECL, Aragon MA, Pescador SN, Salazar GF. *Swim-up procedure in boar semen improves motility and viability but recovered sperm could carry active caspases and chromatin damage*. Journal of Animal and Veterinary Advances 2012 11(4):431-437

Morgan S, Lopes F, Gourley C, Anderson RA, Spears N. *Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin*. PLoS One. 2013 Jul 29;8(7): e70117

Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. *How do chemotherapeutic agents damage the ovary?* Hum Reprod Update 2012 Sep-Oct;18(5):525-35

Moubasher AE, El Din AM, Ali ME, El-sherif WT, Gaber HD. *Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa.* Andrologia 2013 Apr;45(2):135-9

Mutinati M, Piccinno M, Roncetti M, Campanile D, Rizzo A, Sciorsci RL. *Oxidative Stress During Pregnancy in the Sheep.* Reprod Dom Anim 2013 48,353-357

Naz RK, Janousek JT, Moody T, Stillman RJ. *Factors influencing murine embryo bioassay: effects of proteins, aging of medium, and surgical glove coatings.* Fertil Steril 1986 Nov;46(5):914-9

Nelissen EC, Van Montfoort AP, Coonen E et al. *Further evidence that culture media affect perinatal outcome: findings after transfer of fresh and cryopreserved embryos.* Human Reproduction 2012 Jul;27(7):1966-76

Neupane J, Vandewoestyne M, Ghimire S, Lu Y, Qian C, Van Coster R, Gerris J, Deroo T, Deforce D, De Sutter P and Heindryckx B. *Assessment of nuclear transfer techniques to prevent the transmission of heritable mitochondrial disorders without*

compromising embryonic development competence in mice. Mitochondrion 2014 Sep; 18:27-33

Oh SJ, Gong SP, Lee ST, Lee EJ, Lim JM. *Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos in vitro.* Fertil Steril 2007 Oct;88(4 Suppl):1150-7

Oktay K, Buyuk E, Davis O, Yermakova I, Veeck L, Rosenwaks Z. *Fertility preservation in breast cancer patients: IVF and embryo cryopreservation after ovarian stimulation with tamoxifen.* Hum Reprod. 2003 Jan;18(1):90

Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, et al. *Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue.* Lancet 2004 363:837-40

Ottosen LD, Hindkjaer J, Ingerslev J. *Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures.* J Assist Reprod Genet 2007 Feb-Mar;24(2-3):99-103

Pabon J, Findley W, Gibbons W. *The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development.* Fertil Steril 1989 May;51(5):896-900

Paul C, Nagano M, Robaire B. *Aging results in differential regulation of DNA repair pathways in pachytene spermatocytes in the Brown Norway rat.* Biol Reprod 2011 Dec;85(6):1269-78

Peer S, Eltes F, Berkovitz A, Yehuda R, Itsykson P, Bartoov B. *Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by in vitro incubation at 37 degrees C?* Fertil Steril. 2007 Dec;88(6):1589-94

Pegg DE. *Principles of cryopreservation.* Methods Mol Biol 2007 MIMB, volume 368 pag. 39-57

Phillips KP, Le veille M-C, Claman P, Baltz JM. *Intracellular pH regulation in human preimplantation embryos.* Hum Reprod 2000 Apr;15(4):896-904

Piotr M, Filip AD, Aleksandra Z, Mirosław W, and Iwona S. *Do We Pay Enough Attention to Culture Conditions in Context of Perinatal Outcome after In Vitro Fertilization? Up-to-Date Literature Review.* BioMed Research International 2016 285179

Procope BJ. *Effect of repeated increase of body temperature on human sperm cells.* Int J Fertil. 1965 Oct-Dec;10(4):333-9

Quinn P, Harlow GM. *The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro.* J Exp Zool 1978 Oct;206(1):73-80

Rhéaume C, Leblanc MÈ, Poirier P. *Adiposity assessment: explaining the association between obesity, hypertension and stroke*. Expert Review of Cardiovascular Therapy 2011 Dec;9(12):1557-64

Rinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, Dobson AT, Schultz RM. *Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos*. Fertil Steril 2006 Oct;86(4 Suppl):1252-65, 1265.e1-36

Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J and Coomarasamy A. *The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis*. Human Reproduction 2012 Oct;27(10):2908-17

Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C, Dix DJ. *Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice*. Biol Reprod 2001 Jul;65(1):229-39

Roy SC, Atreja SK. *Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa*. Animal Reproduction Science 2008 Aug;107(1-2):68-84

Rosendahl M, Loft A, Byskov AG, Ziebe S, Schmidt KT, Andersen AN, et al. *Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic*

autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. Hum Reprod 2006
21:2006-9

Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Mascha E, Sikka SC, Thomas AJ Jr. *Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility.* Fertil Steril. 2005 Oct;82(4):871-7

Saikhun J, Kitiyanant Y, Vanadurongwan V, Pavasuthipaisit K: *Effects of sauna on sperm movement characteristics of normal men measured by computer-assisted sperm analysis.* Int J Androl. 1998 Dec;21(6):358-63

Salas-Huetos A, Bulló M, and Salas-Salvadó J. *Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies.* Human Reproduction 2017 Jul 1;23(4):371-389

Saalu LC. *The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: an evidence based evaluation.* Pak J Biol Sci. 2010 May 1;13(9):413-22

Salama M and Woodruff TK. *New advances in ovarian autotransplantation to restore fertility in cancer patients.* Cancer Metastasis Rev. 2015 Dec;34(4):807-822

Sansinena M, Santos MV, Zaritzky N, Chirife J. *Comparison of heat transfer in liquid and slush nitrogen by numerical simulation of cooling rates for French straws used for sperm cryopreservation.* Theriogenology 2012 May;77(8):1717-21

Sapanidou V, Taitzoglou I, Tsakmakidis I, Kourtzelis I, Fletouris D, Theodoridis A, Zervos I, Tsantarliotou M. *Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization*. Theriogenology 2015 Nov;84(8):1273-82

Saragusty J, Arav A. *Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification*. Reproduction. 2011 Jan;141(1):1-19

Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. *Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology*. New England Medical Journal 2002 Mar 7;346(10):731-7

Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, Anderson D, Wyrobek AJ. *The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers*. Hum Reprod. 2007 Jan;22(1):180-7. Epub 2006 Oct 19

Schultheis B, Nijmeijer BA, Tin H, Gosden RG, Melo JV. *Imatinib mesylate at therapeutic doses has no impact on folliculogenesis or spermatogenesis in a leukaemic mouse model*. Leuk Res 2012. 30: 271–274

Seckl JR, Nyirenda MJ, Walker BR and Chapman KE. *Glucocorticoids and foetal programming*. Biochem. Soc. Trans. 1999

Seino T, Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Kurachi H. *Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and*

embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. Fertil Steril 2002 Jun;77(6):1184-90

Seli E, Tangir J. *Fertility preservation options for female patients with malignancies.* Curr Opin Obstet Gynecol. 2005 Jun;17(3):299-308

Senn A, Vozzi C, Chanson A, De Grandi P, Germond M. *Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage.* Fertil Steril 2000 74:946-52

Serour GI. *Bioethics in infertility management in the Muslim World.* Sister's Page Islamic World Net 2014

Shahar S, Wisner A, Ickowicz D, Lubart R, Shulman A, Breitbart H. *Light-mediated activation reveals a key role for protein kinase A and sarcoma protein kinase in the development of sperm hyper-activated motility.* Hum Reprod 2011 Volume 26, Issue 9, 1 Sep, Pages 2274–2282

Shaliutina-Kolešová A, Gazo I, Cosson J, Linhart O. *Protection of common carp (Cyprinus carpio L.) spermatozoa motility under oxidative stress by antioxidants and seminal plasma.* Fish Physiol Biochem 2014 Dec;40(6):1771-81

Shefi S, Tarapore PE, Walsh TJ, Croughan M, Turek PJ. *Wet heat exposure: a potentially reversible cause of low semen quality in infertile men.* Int Braz J Urol. 2007 Jan-Feb;33(1):50-6

Shekarriz M, DeWire DM, Thomas AJ Jr, Agarwal A. *A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species.* Eur Urol 1995 28(1):31-5

Sherman RC, Langley-Evans SC. *Early administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril, prevents the development of hypertension programmed by intrauterine exposure to a maternal low-protein diet in the rat.* Clinical Science 1998 Apr;94(4):373-81

Shiraishi K, Matsuyama H, Takihara H. *Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology.* Int J Urol: Offic J Jpn Urol Assoc 2012 Jun;19(6):538-50

Shu JH, Zhang B, Feng GX, Gan XY, Zhou H, Zhou L, Liu Y. *Influence of sperm morphology on the outcomes and neonatal status in IVF-ET.* Zhonghua Nan Ke Xue 2010 Oct;16(10):897-900

Schwarz C, Köster M, van der Ven K, Montag M. *Temperature-induced sperm nuclear vacuolization is dependent on sperm preparation.* Andrologia 2012 May;44 Suppl 1:126-9

Sole M, Santalo J, Boada M, Clua E, Rodriguez I, Martinez F, Coroleu B, Barri PN, Veiga A. *How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes.* Hum Reprod 2013 Aug;28(8):2087-92

Sonmezer M, Oktay K. *Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation.* Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2010; 24(1):113–126

Squirrell JM, Wokosin DL, White JG, Bavister BD. *Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability.* Nat Biotechnol 1999 Aug;17(8):763-7

Steptoe PC, Edwards RG. *Birth after the reimplantation of a human embryo.* Lancet 1978 Aug 12;2(8085):366

Stevens-Simon C, Orleans M. *Low-birthweight prevention programs: the enigma of failure.* Birth 1999 Sep;26(3):184-91

Stuppia L, Franzago M, Ballerini P, Gatta V, Antonucci I. *Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health.* Clinical Epigenetics 2015 Nov 11;7:120

Sugarman J. *Ethics and germline gene editing.* EMBO Rep 2015

Swain JE. *Is there an optimal pH for culture media used in clinical IVF?* Hum Reprod 2012 May-Jun;18(3):333-9

Takenaka M, Horiuchi T, Yanagimachi R. *Effects of light on development of mammalian zygotes.* Proc Natl Acad Sci U S A 2007 Sep 4;104(36):14289-93

Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Longobardi S, Gualtieri R. *Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation.* Reproductive Biology and Endocrinology 2013 Aug 16;11:81

Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, De Stefano C, Ferraro R, Sudhakaran S, Gualtieri R. *Successful slush nitrogen vitrification of human ovarian tissue.* Fertil Steril. 2016 Jun;105(6):1523-1531.e1

Tamara L. and Bart MG. *Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage.* Reproduction 2011 Dec;142(6):759-78

Tamer M. Said, and Jolande A. *Land Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: asystematic review.* Human Reproduction 2011 Nov-Dec;17(6):719-33

Taylor K, Roberts P, Sanders K, Burton P. *Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa*. *Reprod Biomed Online* 2009 Feb;18(2):184-9

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. *Successful culture in vitro of sheep and cattle ova*. *J Reprod Fertil* 1972 Sep;30(3):493-7

The United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO) Universal Declaration on Bioethics and Human Rights. Paris: UNESCO 2005

Thijssen A, Klerkx E, Huyser C, Bosmans E, Campo R, Ombelet W. *Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa*. *Reproductive BioMedicine Online* 2014 Apr;28(4):436-42

Thomas KR, Capecchi MR. *Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene*. *Nature* 1986 Nov 6-12;324(6092):34-8

Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. *High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome*. *Cell* 1986 Feb 14;44(3):419-28

Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM. *Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis*. *Hum Reprod* 2009 Sep;24(9):2061-70

Thonneau P, Bujan L, Multigner L, Mieusset R. *Occupational heat exposure and male fertility: a review*. Hum Reprod 1998 Aug;13(8):2122-5

Tobi EW, Goeman JJ, Monajemi R, Gu H, Putter H, Zhang Y, et al. *DNA methylation signatures link prenatal famine exposure to growth and metabolism*. Nat Commun 2014 Nov 26;5:5592

Tomlinson MJ, Barratt CL, Bolton AE, Lenton EA, Roberts HB, Cooke ID. *Round cells and sperm fertilizing capacity: the presence of immature germ cells but not seminal leukocytes are associated with reduced success of in vitro fertilization*. Fertil Steril. 1992 Volume 58, Issue 6, Pages 1257–1259

Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T. *Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos*. Mol Reprod Dev 1992 Jan;31(1):28-33

van Renselaer Potter. *Bioethics: the Science of Survival*. Perspectives in Biology and Medicine 1970 Volume 14, Number 1, pp. 127-153

Van Voorhis BJ, Ryan GL. *Ethical obligation for restricting the number of embryos transferred to women: combating the multiple-birth epidemic from in vitro fertilization*. Semin Reprod Med 2010 Jul;28(4):287-94

von Wolff M, Donnez J, Hovatta O, Keros V, Maltaris T, Montag M, Salle B, Sonmezer M, Andersen CY. *Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy--a technique in its infancy but already successful in fertility preservation.* Eur J Cancer. 2009 Jun;45(9):1547-53. Epub 2009 Mar 4

Varisli O, Agca C, Agca Y. *Short-term storage of rat sperm in the presence of various extenders.* J Am Assoc Lab Anim Sci. 2013 Nov;52(6):732-7

Vermeiden JP, Bernardus RE.
Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? Fertil Steril. 2013 Mar 1;99(3):642-51

Virant-Klun I, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E, Vogler A, Krsnik M, Meden-Vrtovec H. *Increased ammonium in culture medium reduces the development of human embryos to the blastocyst stage.* Fertil Steril 2006 Feb;85(2):526-8

Wale PL, Gardner DK. *Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients.* Reprod Biomed Online 2010 Sep;21(3):402-10

Wales RG, Whittingham DG. *Decomposition of sodium pyruvate in culture media stored at 5 degrees C and its effects on the development of the preimplantation mouse embryo.* J Reprod Fertil 1971 Jan;24(1):126

Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One* 2010 Jan 27;5(1):e8772

Wang T, Sha H, Ji D, Zhang HL, Chen D, Cao Y and Zhu J. *Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases*. *Cell* 2014 Jun 19;157(7):1591-604

Whitten WK. *Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro*. *Adv Biosci* 1971 6:129–141

Whitten WK. *The effect of oxygen on cleavage of mouse eggs*. In: Abstracts of 2nd Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, Davis, California, 1969

Whittington K, Ford WC. *Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions*. *Int J Androl* 1999 Aug;22(4):229-35

Will MA, Clark NA, Swain JE. *Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success*. *J Assist Reprod Genet* 2011 Aug;28(8):711-24

Wolin KY, Carson K, Colditz GA. *Obesity and cancer*. *Oncologist*. 2010 vol. 15no. 6 556-565

Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. *Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues*. Cryobiology. 2004 146-56

World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th edition. Geneva: World Health Organization; 2010

Wright C, Milne S, Leeson H. *Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility*. Reprod Biomed Online 2014 Jun;28(6):684-703

WuY, Liang D, Wang Y, Bai M, TangW, Bao S, Yan Z, Li D, Li J. *Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9*. Cell Stem Cell 2013 Dec 5;13(6):659-62

Yelumalai S, Kashir J, Jones C, Bagheri H, Lin Oo S, McLaren L. *Clinician-induced (iatrogenic) damage incurred during human infertility treatment: Detrimental effects of sperm selection methods and cryopreservation upon the viability, DNA integrity, and function of human sperm*. Asian Pacific Journal of Reproduction 2012 Volume 1, Issue 1, Pages 69-75

Young L, Fernandes EK, McEvoy TG et al. *Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture*. Nature Genetics 2001 Feb;27(2):153-4

Yu S, Long H, Lyu QF, Zhang QH, Yan ZG, Liang HX, Chai WR, Yan Z, Kuang YP, Qi C. *Protective effect of quercetin the development of preimplantation mouse embryos against hydrogen peroxide-induced oxidative injury*. PLoS One 2014 Feb 21;9(2):e89520

Zander DL, Thompson JG, Lane M. *Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages*. Biol Reprod 2006 Feb;74(2):288-94

Zander-Fox DL, Mitchell M, Thompson JG, Lane M. *Alterations in mouse embryo intracellular pH by DMO during culture impair implantation and fetal growth*. Reprod Biomed Online 2010 Aug;21(2):219-29

Zandstra H, Van Montfoort AP, and Dumoulin JC. *Does the type of culture medium used influence birth weight of children born after IVF?* Human Reproduction 2015 Mar;30(3):530-42

Zhu J, Li M, Chen L, Liu P, and Qiao J. *The protein source in embryo culture media influences birthweight: a comparative study between G1 v5 and G1-PLUS v5*. Human Reproduction 2014 Jul;29(7):1387-92. Epub 2014 May 8

Zini A, Al-Hathal N. *Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction?* Asian J Androl 2011 May;13(3):374-81

Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L.
Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. Fertil
Steril 2010 Jan;93(1):159-66

Zribi N, Chakroun NF, Ben Abdallah F, Elleuch H, Sellami A, Gargouri J, Rebai T,
Fakhfakh F, Keskes LA. *Effect of freezing-thawing process and quercetin on human
sperm survival and DNA integrity.* Cryobiology 2012 Dec;65(3):326-31