







**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”**



**Tesi di Dottorato**

**“Strategie di prevenzione dell’apoptosi indotta dal congelamento per migliorare la criotolleranza di embrioni e gameti bovini”**

**Coordinatore**  
Prof. Giuseppe  
Cringoli

**Candidato**  
Dott.ssa Carolina  
De Canditiis

**Tutor**  
Prof.ssa Bianca  
Gasparrini



*A Ginevra,  
la parte migliore di me.*



<b>Lista delle abbreviazioni</b>	11	
<b>Lista delle figure</b>	13	
<b>Lista delle tabelle</b>	15	
<b>Abstract</b>	17	
<b>Introduzione</b>		
I	Le Biotecnologie applicate alla Riproduzione	21
II	Bibliografia	23
<b>Capitolo 1</b>		
1.1	Inseminazione Strumentale	27
1.2	Superovulazione e trasferimento embrionale	28
1.3	Produzione embrionale in vitro	30
1.3.1	Recupero degli oociti	31
1.3.2	Maturazione in vitro	33
1.3.3	Fecondazione in vitro	36
1.3.4	Coltura in vitro	39
	Bibliografia	44
<b>Capitolo 2</b>		
2.1	La Crioconservazione	59
2.2	Fisica della crioconservazione	62
2.3	I Media di Congelamento	65
2.4	Principali tecniche di crioconservazione	67
2.4.1	Il congelamento lento	67
2.4.2	Il congelamento rapido	68
2.4.3	La vitrificazione	68
2.5	Crioconservazione degli embrioni	71
2.6	Crioconservazione degli oociti	73
2.7	Crioconservazione degli spermatozoi	75
2.8	Danni da congelamento e apoptosi	77
2.9	Scopo del lavoro	82
	Bibliografia	84

**Capitolo 3**

3.1	Materiali e metodi	97
3.1.1	Disegno sperimentale	97
3.1.2	Terreni e reagenti	98
3.1.3	Produzione Embrionale In Vitro	98
3.1.4	Vitrificazione e scongelamento	99
3.1.5	Differential Staining e valutazione della frammentazione del DNA, mediante Colorazione Tunel	100
3.1.6	Immunoistochimica per Caspasi 3	101
3.2	Analisi statistica	105
3.3	Risultati	106
3.4	Discussione	113
	Bibliografia	116

**Capitolo 4**

4.1	Materiali e metodi	123
4.1.1	Disegno sperimentale	123
4.1.2	Terreni e reagenti	124
4.1.3	Raccolta oociti e maturazione in vitro (IVM)	125
4.1.4	Vitrificazione e riscaldamento	125
4.1.5	Fecondazione e coltura in vitro	126
4.1.6	Valutazione della frammentazione del DNA, mediante Colorazione Tunel/Hoechst 33342	126
4.1.7	Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\Psi_m$	128
4.1.8	Immunoistochimica per caspasi 3	130
4.2	Analisi statistica	132
4.3	Risultati	133
4.4	Discussione	136
	Bibliografia	141

**Capitolo 5**

5.1	Materiali e metodi	145
5.1.1	Disegno sperimentale	145
5.1.2	Terreni e reagenti	146
5.1.3	Preparazione dei campioni spermatici prima dell'incubazione	146



5.1.4	Valutazione della motilità	146
5.1.5	Valutazione della vitalità mediante colorazione Trypan blue/Giemsa	148
5.1.6	Valutazione dell'integrità di membrana mediante hypotonic swelling test (HOS test)	149
5.1.7	Valutazione della frammentazione del DNA mediante colorazione Tunel e Hoechst 33342	150
5.1.8	Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\Psi_m$	151
5.1.9	Citofluometria per Caspasi 3	152
5.2	Analisi statistica	153
5.3	Risultati	154
5.4	Discussione	161
	Bibliografia	164
	Conclusioni	167
	Bibliografia	170



## Lista delle abbreviazioni

AC	Adenilatociclastasi
ALH	Ampiezza dello spermatozoo laterale della testa
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BL	Blastocisti
BS	Soluzione di vitrificazione
BS	Siero bovino
BSA	Albumina del siero bovino
BSL	Velocità lineare spermatica
COC	Complesso cumulo-oocita
CP	Crioprotettore
DABCO	1,4-diazabicyclo-octane
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetilsolfossido
DS	Differentialstaining
EAA	Aminoacidi essenziali
eBL	Blastocisti precoci
EG	Glicole etilenico
EGF	Fattore di crescita dell'epidermide
ET	Trasferimento embrionale
FCS	Siero fetale bovino
FSH	Ormone follicolo stimolante
GSH	Glutazione
GV	Vescicola germinale
HBL	Blastocisti sgusciate
HOS-test	Hypo-osmotic swelling test
ICM	Massa cellulare interna
ICSI	Iniezione intracitoplasmatica di spermatozoo
IS	Inseminazione strumentale
IVC	Coltura in vitro
IVEP	Produzione embrionale in vitro
IVF	Fecondazione in vitro
IVM	Maturazione in vitro
LH	Ormone luteinizzante
LN <sub>2</sub>	Azoto liquido
MII	Metafase II
MOET	Ovulazione multipla e trasferimento embrionale
NEAA	Aminoacidi non essenziali
OPU	Ovum pick-up

## Lista delle abbreviazioni

PBS	Tampone fosfato salino
PFA	Parafolmaldeide
PKA	Proteina chinasi A
PVP	Polivinilpirrolidone
ROS	Specie reattive dell'ossigeno
RT	Temperatura ambiente
SCA	Spermclassanalyzer
SO	Superovulazione
SOF	Syntheticoviductalfluid
TCM 199	Tissue culture medium 199
TE	Trofoectoderma
TNF-R	Fattore di necrosi tumorale
VAP	Average pathvelocity
VCL	Velocità curvilinea
VS	Soluzione di vitrificazione
XBL	Blastocisti espanse
XIAP	Inibitore dell'apoptosi X-linked
ZP	Zona pellucida

- 1.1 Oocita bovino di grado A e B
- 2.1 Attivazione dell'apoptosi
- 3.1 Colorazioni Hoechst 33342, PI, Tunel di blastocisti bovine al giorno 7
- 3.2 Colorazione DAPI e immunistochemica di blastocisti bovine al giorno 7
- 3.3 Percentuali di blastocisti con livelli bassi, medi e alti di apoptosi
- 4.1 Colorazione Hoechst 33342 e Tunel di oociti bovini maturi
- 4.2 Colorazione JC-1 di oociti bovini maturi
- 4.3 Colorazione Hoechst 33342 e immunistochemica di oociti bovini maturi
- 4.4 Percentuali di oociti con DNA frammentato
- 4.5 Percentuali del potenziale di membrana mitocondriale degli oociti
- 5.1 Parametri cinetici Sperm Class Analyzer
- 5.2 Colorazione Trypan Blue/Giemsa di spermatozoi
- 5.3 HOS-test
- 5.4 Percentuali di motilità allo scongelamento di spermatozoi bovini
- 5.5 Percentuali di spermatozoi con DNA frammentato
- 5.6 Percentuali di spermatozoi con alto potenziale di membrana mitocondriale



- 3.1 Sopravvivenza, sviluppo e schiusa dopo 24 e 48 ore post-riscaldamento di blastocisti in assenza o presenza di Z-VAD-FMK
- 3.2 Distribuzione delle cellule nel nodo embrionale e nel trofotoderma al giorno 7 di blastocisti bovine vitrificate a 0 e 48 ore post riscaldamento in assenza o presenza di Z-VAD-FMK
- 3.3 Media e relative percentuali di frammentazione del Dna su cellule totali, nodo embrionale e trofotoderma dopo 48 ore post-riscaldamento di in assenza o presenza di Z-VAD-FMK
- 3.4 Effetti di Z-VAD-FMK a 0 e 48 ore post-riscaldamento di blastocisti in assenza o presenza di Z-VAD-FMK
- 4.1 Tassi di sopravvivenza, di cleavage e rese in blastocisti di oociti freschi e vitrificati in assenza e presenza di 20  $\mu$ M ZVAD-FMK)
- 4.2 Attività della caspasi 3 attivata in oociti freschi e in oociti vitrificati in assenza e presenza dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK
- 5.1 Percentuali di motilità, vitalità, integrità di membrana e frammentazione del DNA nel seme fresco e in quello congelato
- 5.2 Percentuali di vitalità e integrità di membrana nei gruppi trattati con 0, 20 e 100  $\mu$ M prima del congelamento.
- 5.3 Percentuali di motilità, vitalità e integrità di membrana nelle diverse condizioni sperimentali di incubazione
- 5.4 Percentuali di spermatozoi con DNA frammentato, alto potenziale di membrana e caspasi 3 attiva nelle diverse condizioni sperimentali post-incubazione





Diverse strategie sono state sviluppate per minimizzare i danni apoptotici indotti dalla crioconservazione. In particolare, sono stati testati diversi inibitori dell'apoptosi nel tentativo di preservare l'integrità delle membrane senza alterarne il potenziale, ridurre la frammentazione del DNA in seguito all'insulto del congelamento e modulare l'attività delle caspasi bloccando il segnale apoptotico. Pertanto, lo scopo della tesi è stato quello di individuare delle possibili strategie di prevenzione dell'apoptosi indotta dal congelamento, mediante inibizione delle caspasi, al fine migliorare la criotolleranza degli embrioni e dei gameti (oociti e spermatozoi) nella specie bovina. In particolare, è stato investigato l'effetto dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK all'interno dei terreni di vitrificazione, scongelamento e coltura per gli embrioni e per gli oociti e dei terreni di congelamento e incubazione per gli spermatozoi al fine di ridurre l'apoptosi e i danni da congelamento, migliorando la criotolleranza post-scongelamento degli embrioni e dei gameti bovini.

Lo scopo dell'esperimento 1 è stato quello di valutare l'effetto dell'aggiunta dell'inibitore Z-VAD-FMK (20 $\mu$ M) prima, durante e dopo la vitrificazione sulla criotolleranza degli embrioni bovini prodotti in vitro. A tale fine sono state valutate la sopravvivenza, la progressione allo sviluppo e le percentuali di schiusa delle blastocisti vitrificate dopo 24 e 48 ore di coltura di post-riscaldamento, nonché il numero di cellule embrionali e la loro distribuzione tra trofotoderma e nodo embrionale. Inoltre l'influenza dell'inibitore sull'apoptosi è stata valutata mediante misurazione della frammentazione del DNA e dell'attività della caspasi 3. Lo scopo dell'esperimento 2, è stato quello di studiare gli effetti dell'inibitore Z-VAD-FMK (20 $\mu$ M), prima, durante e dopo la vitrificazione sulla criotolleranza degli oociti bovini maturati in vitro. L'efficacia dell'inibitore sulla prevenzione dell'apoptosi è stata valutata mediante stima della frammentazione del DNA, dell'attività caspasi, del potenziale di membrana mitocondriale, nonché della vitalità e della competenza allo sviluppo embrionale dopo fecondazione in vitro.

L'esperimento 3 si è, infine, prefisso l'obiettivo di studiare l'influenza di un trattamento con l'inibitore Z-VAD-FMK (20 e 100  $\mu$ M) prima, durante e dopo il congelamento sulla criotolleranza degli spermatozoi bovini. L'efficacia del trattamento è stata verificata su diversi parametri indicativi di fertilità spermatica, quali la motilità, la vitalità, l'integrità di membrana, la frammentazione del DNA, l'attività della Caspasi 3 ed il potenziale di membrana mitocondriale.

I risultati dell'esperimento 1 hanno dimostrato che il trattamento con l'inibitore della caspasi Z-VAD-FMK, migliora la criotolleranza degli

embrioni bovini prodotti in vitro, prevenendo l'apoptosi indotta da crioconservazione come dimostrato dalle maggiori percentuali di sopravvivenza (76.1 vs 51.1%,  $P < 0.01$ ), sviluppo (63.2 vs 38.5%,  $P < 0.01$ ) e sgusciamento (26.5 vs 17.6%;  $P < 0.05$ ) dopo 48 ore di coltura post-riscaldamento. Inoltre, il trattamento con Z-VAD-FMK ha determinato una riduzione del numero ( $4.7 \pm 0.3$  vs  $7.7 \pm 0.5$ ;  $P < 0.01$ ) e della percentuale ( $3.4 \pm 0.2$  vs  $6.1 \pm 0.5$ ;  $P < 0.01$ ) di cellule con DNA frammentato così come dei livelli di caspasi ( $1.46 \pm 0.17$  vs  $5.06 \pm 0.41$ ,  $P < 0.01$ ) dopo 48 ore di coltura post-riscaldamento.

I risultati dell'esperimento 2 hanno confermato che la vitrificazione determina danni a livello del DNA e del potenziale di membrana mitocondriale che si traducono in una ridotta sopravvivenza e competenza allo sviluppo degli oociti bovini, attestata dalla diminuzione significativa dei tassi di cleavage ( $73.1 \pm 6.1$  vs  $42.4 \pm 1.7$ ,  $P < 0.05$ ) e blastocisti ( $40.1 \pm 8.5$  vs  $6.7 \pm 2.0$ ,  $P < 0.05$ ). L'ipotesi del lavoro non è però stata confermata, in quanto il trattamento degli oociti con l'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK prima, durante e dopo la vitrificazione, non è risultato efficace nel prevenire l'apoptosi indotta dalla crioconservazione stessa né tantomeno nel migliorare la resistenza degli oociti al processo di crioconservazione.

Analogamente i risultati dell'esperimento 3 hanno confermato che il congelamento determina una riduzione della motilità ( $73.3 \pm 1.05$  vs  $70.0 \pm 1.05$ ,  $P < 0.05$ ), della percentuale di spermatozoi con membrana integra ( $73.8 \pm 1.6$  vs  $67.1 \pm 1.2$ ,  $P < 0.05$ ) e della percentuale di spermatozoi che mostravano frammentazione del DNA ( $1.1 \pm 0.6$  vs  $15.4 \pm 2.8$ ,  $P < 0.01$ ). Inoltre, un dato inatteso riguarda, analogamente, però, a quanto riscontrato nell'esperimento 2 sugli oociti, l'inefficacia di Z-VAD-FMK nell'inibire l'attività caspasi, come attestato dall'assenza di differenze tra i vari gruppi nella percentuale di spermatozoi che esprimevano la forma attiva di caspasi. In conclusione, i risultati di questo studio hanno dimostrato che il trattamento degli embrioni bovini prodotti in vitro in presenza di Z-VAD-FMK ne aumenta la criotolleranza limitando l'apoptosi indotta da crioconservazione. Questa potrebbe essere una strategia semplice ed economica per migliorare l'efficienza della crioconservazione degli embrioni bovini, fondamentale per una maggiore diffusione della tecnologia di produzione embrionale in vitro in campo. Tuttavia, la strategia di prevenire l'apoptosi indotta da crioconservazione con Z-VAD-FMK non è perseguibile per migliorare la criotolleranza dei gameti bovini alle dosi testate. Ne consegue la necessità di approfondire lo studio testando diverse

concentrazioni dell'inibitore e tempi di esposizione prima di escluderne un potenziale utilizzo come "crioprotettore".



Le biotecnologie della riproduzione animale hanno un ruolo centrale nell'efficienza produttiva e nel miglioramento genetico degli animali domestici. Pertanto, i progressi delle tecnologie riproduttive saranno fondamentali per soddisfare le future richieste di una popolazione globale in aumento, oltre a dare un contributo per superare le difficoltà future nella produzione animale causate dai cambiamenti climatici. Queste nuove tecnologie hanno contribuito in maniera decisiva all'evoluzione dell'allevamento negli ultimi 60 anni (Thibier, 2005), permettendo di porre le basi per una radicale trasformazione della zootecnia e dei sistemi produttivi. Lo scopo delle biotecnologie attualmente utilizzate nell'allevamento del bestiame è quello di potenziare le performance riproduttive e ottenere in tempi sempre più brevi un notevole incremento genetico, senza però trascurare quelle che sono le esigenze del consumatore, sempre più sensibile alla qualità del prodotto e al benessere degli animali. Le moderne tecniche di riproduzione comprendono l'inseminazione strumentale (IS), la superovulazione (SO) e il trasferimento embrionale (ET) anche indicata con l'acronimo MOET (Multiple Ovulations and Embryo Transfer), il sessaggio embrionale, la produzione embrionale in vitro (IVEP) e la crioconservazione delle cellule germinali (spermatozoi ed oociti) e degli embrioni. L'utilizzo combinato di alcune tecnologie consente di accelerare il miglioramento genetico, conseguendone una maggiore produttività e prestazione riproduttiva degli animali da reddito, massimizzando al contempo l'utilizzo di risorse naturali. In generale, il miglioramento genetico nei grandi mammiferi è ostacolato da numerosi fattori, tra i quali il lungo intervallo generazionale, con la produzione di un solo redo per anno (caratteristiche che rendono necessarie lunghe attese prima di riuscire ad ottenere una reale valutazione dei soggetti) e la ricombinazione genetica che avviene ad ogni fecondazione, fenomeno questo che non rende possibile prevedere il valore genetico del nuovo individuo, a meno che non si ricorra alla valutazione delle produzioni delle figlie, mediante prove di progenie, nel caso dei maschi, oppure dei dati di lattazione, nel caso delle femmine. Ciononostante, passi in avanti sono stati fatti negli ultimi anni grazie all'utilizzo dell'IS che ha consentito l'introduzione di genotipi desiderati nell'ambito di una popolazione, in tempi notevolmente ridotti, contribuendo al miglioramento genetico per via paterna e dando così quella spinta necessaria alla diffusione di tale tecnica, oggi utilizzata inoltre l'80% della popolazione bovina europea (Morrell, 2011). Tra le diverse tecnologie citate fino ad ora l'IS ha lo svantaggio di concentrarsi principalmente sulla componente genetica del maschio, mentre le tecniche che meglio si prestano

ad ottenere in tempi brevi un rapido miglioramento genetico e ad esaltare il contributo materno, sono la MOET e l'Ovum pick-up (OPU) associato all'IVEP. Per meglio comprendere l'importanza e la diffusione di queste tecnologie, basta pensare che più di mezzo milione di embrioni bovini sono stati trasferiti nel 2003, di cui il 40% erano congelati/scongelati e il 18% prodotti in vitro (Thibier, 2004). A livello mondiale, l'ET sta aumentando considerevolmente nel settore dell'allevamento bovino, principalmente a causa dell'aumento del trasferimento di embrioni prodotti in vitro. Nel 2012 sono stati trasferiti 500.000 embrioni prodotti dalla superovulazione e 400.000 da sistemi di produzione in vitro (Stroud, 2011). La stragrande maggioranza di questi trasferimenti si attua in Sud America, in particolare in Brasile. L'uso crescente di embrioni bovini prodotti in vitro è indicativo del successo della tecnica in questa specie. Nei cavalli, invece, non è stato possibile sviluppare un metodo affidabile per la fecondazione in vitro. Pertanto, la tecnica più comunemente utilizzata rispetto alla fecondazione in vitro (IVF) per gli equidi è l'iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI), anche se la necessità di attrezzature specializzate e di personale altamente qualificato limita l'uso di questa tecnica. Al contrario, l'ICSI non è comunemente utilizzata per gli oociti bovini a causa di alcune limitazioni quali l'inadeguata attivazione dell'oocita (Malcuit et al., 2006) e i danni del citoscheletro (Galli et al., 2003), ma anche perché il sistema di IVF è stato ottimizzato. Le biotecnologie della riproduzione anche in campo umano hanno permesso di fronteggiare con successo quadri d'infertilità e risultano dei validi strumenti nella lotta contro il cancro, l'invecchiamento cellulare, patologie pre e post natali. Infatti, grazie alle numerose acquisizioni scientifiche che caratterizzano il loro studio, sono in grado di fornire preziose informazioni su processi biologici e patologici dell'organismo.

- Galli C, Vassiliev I, Lagutina I, Galli A, Lazzari G; 2003. Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. *Theriogenology*. 60(8):1467-80.
- Malcuit C, Maserati M, Takahashi Y, Page R, Fissore RA; 2006. Intracytoplasmic sperm injection in the bovine induces abnormal  $[Ca^{2+}]_i$  responses and oocyte activation. *Reprod Fertil Dev*. 18(1-2):39-51.
- Morrell JM (2011). Artificial Insemination: Current and Future Trends, Artificial Insemination in Farm Animals, Dr. Milad Manafi (Ed.), ISBN: 978-953-307-312-5. InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificial-insemination-current-andfuture-trends>
- Stroud B; (2011) IETS Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. IETS Newsletter.
- Thibier M; 2004. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. Data Retrieval Committee Annual Report. IETS Newslett. 22(4): 12–9.
- Thibier M; 2005. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev*. 45: 235–242.





# **Capitolo 1**

## Le Biotecnologie applicate alla riproduzione



## 1.1 Inseminazione Strumentale

L'inseminazione strumentale è stata una delle prime tecniche, nell'ambito delle biotecnologie riproduttive, ad essere utilizzata negli allevamenti animali; quando parliamo di IS intendiamo la deposizione meccanica del seme nell'apparato riproduttore femminile. L'IS per la specie bovina rappresenta il principale strumento operativo per la selezione genetica. In poco più di mezzo secolo questa procedura è diventata una tecnica di routine per quasi la totalità degli allevamenti bovini da latte. I vantaggi di questa tecnica sono rappresentati dalla prevenzione di malattie veneree alla possibilità di generare multiple generazioni filiali per toro, in poco tempo. Ciò permette una rapida valutazione genetica dell'animale attraverso le prestazioni delle figlie. La svolta che ha portato al grande utilizzo di questa tecnica è avvenuta tra gli anni 60-70, periodo in cui è migliorata anche la tecnica di crioconservazione del seme, con il vantaggio di poter conservare il seme per anni e la possibilità di poter fecondare animali che si trovavano a diverse migliaia di chilometri di distanza dal toro o utilizzare il seme in qualsiasi momento anche dopo la morte del donatore; inoltre, la crioconservazione ha facilitato l'applicazione commerciale dell'IS in quanto il trasporto del seme è più semplice ed economico, se consideriamo che il costo del trasporto di un animale è molto superiore e comporta un notevole stress che influisce negativamente sulla sfera riproduttiva. Al giorno d'oggi, le tecniche per la crioconservazione del seme sono talmente ben standardizzate che la qualità di quest'ultimo rispetto al fresco è diventato un problema secondario. L'inseminazione strumentale sarebbe auspicabile anche nell'ambito dei programmi di miglioramento genetico di altre specie come nella bufala, però, alcuni fattori fisiologici, quali l'ampia variabilità della durata delle manifestazioni estrali, l'alta incidenza di calori silenti ed il riscontro di doppie manifestazioni estrali, hanno reso gli interventi di IS difficilmente programmabili, anche quando si ricorre alla sincronizzazione dei calori (Zicarelli, 2002). Tuttavia, recentemente è stato evidenziato un miglioramento dell'efficienza dei protocolli per la sincronizzazione dell'estro e dell'ovulazione della bufala (Neglia et al., 2008) e un conseguente miglioramento dell'efficienza dell'IS che è addirittura raddoppiata (dal 25 al 50%) negli ultimi 20 anni (Zicarelli et al., 1997; Baruselli et al., 2001; Campanile et al., 2011; Neglia et al., 2015).

## 1.2 Superovulazione e trasferimento embrionale

La MOET è la tecnologia attualmente utilizzata per ottenere più dell'80 % degli embrioni prodotti a scopo commerciale nel mondo. La superovulazione è una tecnica che consente di indurre ovulazioni multiple in animali che generalmente hanno un'unica ovulazione. A questo scopo, gli animali, previamente sottoposti a somministrazione di ormoni esogeni, in particolare progestageni, vengono trattati con dosi frazionate di estratti ipofisari di origine ovina o suina, i quali sono in grado di promuovere la maturazione e la deiscenza di un numero di follicoli superiore a quello fisiologico. La SO viene effettuata tra il 9° e l'11° giorno del ciclo estrale, in concomitanza con l'emergenza della seconda ondata follicolare. In prossimità dell'ovulazione gli animali trattati vengono inseminati e dopo 6-7 giorni, mediante flushing (lavaggio con una soluzione isotonica tamponata delle corna uterine), si effettua il recupero degli embrioni; questi ultimi vengono poi trasferiti in femmine riceventi precedentemente sincronizzate oppure congelati e trasferiti in un secondo momento. L'ET può essere considerato la controparte femminile dell'IS (Jainudeen et al., 1993). Al fine di ottenere i migliori risultati è necessario utilizzare tale tecnica solo in soggetti con perfette condizioni sanitarie del tratto genitale, con pervietà delle tube, con cicli regolari e non gravidi. I programmi MOET hanno il vantaggio di aumentare l'intensità di selezione genetica, riducendo gli intervalli generazionali (Smith, 1988), ed oggi sono anche comunemente usati per selezionare i tori da utilizzare per l'IS (Bondoc et al., 1989; Teepker et al., 1989).

In questo caso le donatrici scelte vengono fecondate con il seme di tori miglioratori e le femmine della progenie che ne deriva vengono messe in produzione, mentre i fratelli vengono messi in attesa dei risultati di produzione delle sorelle (Smith e Ruane, 1987). I maschi vengono quindi testati e scelti in base alle prestazioni delle sorelle, invece che della loro prole, come accadeva con la sola IS. In questo modo è possibile testare geneticamente un toro in tre anni e mezzo invece che in cinque anni e mezzo usando i tradizionali test di progenie. Tuttavia esistono diversi fattori limitanti che influenzano la risposta degli animali alla SO: questi possono essere intrinseci, quali l'individuo stesso, l'età e la razza, e fattori estrinseci, quali la stagione, l'ambiente, la nutrizione delle donatrici e delle riceventi, la quantità dei trattamenti ripetuti, senza dimenticare le condizioni sanitarie del tratto genitale, in quanto la stimolazione ormonale può essere fatta solo su soggetti che mostrano cicli regolari, pervietà delle tube e che non sono

gravidi. Un altro fattore che non va dimenticato è la possibilità di eventuali effetti collaterali dovuti ai trattamenti ripetuti, quali sindromi cistiche, possibili difficoltà ad ingravidarsi ed il rilassamento dei legamenti mammari. Il recupero medio che si osserva nella specie bovina è di 5 embrioni ma varia a seconda della razza e del trattamento di SO impiegato (Halser et al., 2003; Baruselli et al., 2006). Il 24% degli animali non produce embrioni vitali, il 46% produce meno del numero medio di embrioni trasferibili, mentre il 30% produce il 70 % degli embrioni trasferibili (Mapletoft & Bo, 2014).

### 1.3 Produzione embrionale in vitro

La produzione embrionale in vitro è una valida alternativa alla produzione embrionale in vivo soprattutto con l'avvento della metodica dell'OPU. Nei primi approcci, la produzione embrionale in vitro era limitata al cosiddetto salvataggio genetico di animali di pregio morti o destinati alla macellazione perché giunti alla fine della propria carriera produttiva. Attualmente il recupero degli oociti può essere effettuato da materiale proveniente da macello o da animali vivi tramite la tecnica OPU. Questo procedimento consiste nel prelievo in vivo, per via transvaginale ecoguidata, di oociti immaturi da animali donatori noti, consentendo, grazie alla sua ripetibilità, il recupero di una notevole quantità di oociti che vengono poi introdotti nel sistema di IVEP. Quest'ultimo prevede una fase di maturazione in vitro (IVM), una fase di IVF ed una fase di coltura in vitro (IVC) fino allo stadio di blastocisti, stadio in cui gli embrioni possono essere trasferiti o sottoposti a sessaggio e/o congelamento. Il primo vitello prodotto in vitro (IVP) è nato nel 1981 (Brackett et al., 1982), mentre nel 1988 un gruppo di ricerca olandese ha effettuato il primo OPU nella specie bovina, dimostrando la possibilità di recuperare gli oociti senza compromettere la salute e l'attività riproduttiva degli animali (Pieterse et al., 1988). Nel 2011, il numero totale di embrioni bovini IVP trasferibili in tutto il mondo era di 453.471 (Stroud, 2011) che comprendeva però embrioni prodotti da OPU e da macello. La tecnica OPU è molto vantaggiosa perché può essere utilizzata qualora la SO non fosse possibile, come in soggetti che non godono di perfette condizioni sanitarie del tratto genitale come occlusioni tubariche o patologie oviduttali-uterine, in soggetti gravidi fino al 4° mese, aciclici, prepuberi e in quelli a fine carriera (di età avanzata). Inoltre la tecnica non interferisce con i normali cicli riproduttivi e produttivi dell'animale e non necessita di un pretrattamento con gonadotropine. Quest'ultimo è un importante vantaggio specialmente per gli animali giovani, o quelli in lattazione, nei quali, la stimolazione con le gonadotropine può causare edema mammario e cisti ovariche. È una tecnica facilmente eseguibile, non invasiva e ripetibile, che consente di visualizzare e, quindi, aspirare, tutti i follicoli ecograficamente visibili, a partire dal diametro di 2 mm, non interferisce con lo stato fisiologico della donatrice (Janssen-Caspers et al., 1988), permettendo il recupero di una notevole quantità di oociti meioticamente competenti. Il prelievo degli oociti immaturi può essere effettuato una o due volte alla settimana, per tempi anche molto lunghi, senza effetti negativi sulla fertilità degli animali (Chastant-Maillard et al., 2003). Inoltre è stato osservato che

un prelievo effettuato 2 volte a settimana fa sì che la qualità degli oociti migliori dopo i primi trattamenti, perché in questo modo si azzera il ciclo follicolare, si evita il fenomeno della dominanza e, quindi, si elimina l'impatto negativo del follicolo dominante sulla competenza allo sviluppo degli oociti dei follicoli subordinati. Quindi un altro fattore che incide positivamente sulla qualità delle cellule uovo è l'intervallo tra sedute. Perciò il numero di oociti di buona qualità recuperati risulta maggiore con il prelievo fatto due volte la settimana, a distanza di 3-4 giorni, rispetto a quello eseguito una volta a settimana (Merton et al., 2003, Hanenberg et al., 1997). In quest'ultimo caso, infatti, c'è un maggiore numero di oociti che presentano espansione del cumulo e atresia (Garcia et al., 1998). L'uso combinato di OPU ed IVEP rappresenta attualmente lo strumento più valido per incrementare il numero di ET ottenibile per donatrice in un determinato intervallo di tempo, nella maggior parte delle specie. Attualmente nella specie bovina, il numero di oociti ottenuti in un programma OPU caratterizzato da due prelievi settimanali, varia da 0.5 a 15 per animale con circa il 20 % di oociti nudi o degenerati (Hasler et al., 1995). Inoltre, grazie alla ripetibilità dei prelievi la produzione media di embrioni prodotti ad esempio nell'arco di sei mesi aumenta significativamente (52 vs 30 nella bovina rispettivamente con le tecniche OPU e SO; Galli et al., 2014). La possibilità di utilizzare tale tecnica su animali di elevato valore produttivo, si traduce in una notevole riduzione dell'intervallo generazionale e, conseguentemente, in un'accelerazione del progresso genetico.

### *1.3.1 Recupero degli oociti*

Uno dei fattori che influisce negativamente sulla produzione embrionale in vitro è la scarsa reperibilità di materiale sperimentale da destinare alla ricerca. Infatti, quando quest'ultimo è rappresentato da oociti provenienti da OPU, il problema è rappresentato dalla necessità di dover disporre continuamente di un elevato numero di soggetti da sottoporre 2 volte a settimana a tale procedura, in modo tale da garantire un numero costante di oociti da utilizzare nei vari esperimenti. Per ridurre costi e i tempi nella pratica di laboratorio, è, quindi, necessario ricorrere ad ovaie di animali da macello come fonte di oociti. La raccolta dei complessi cumulo-oocita (COC) da materiale da macello può essere eseguita con diversi metodi quali lo "slicing" e l'aspirazione follicolare (Boni, 1994; 1994a); è quest'ultima, però, quella che viene maggiormente impiegata nella pratica di laboratorio. L'aspirazione dei follicoli viene quindi effettuata grazie ad un ago collegato

ad una pompa da vuoto al fine di mantenere costante la pressione ed evitare un eccessivo dispendio di tempo che potrebbe compromettere la vitalità degli oociti. I COC recuperati vengono classificati e divisi in base alla morfologia del citoplasma e del cumulo, perché esiste una precisa correlazione tra l'aspetto morfologico e la competenza, questa intesa come capacità dell'oozita di essere fecondata e di svilupparsi fino allo stadio di blastocisti. Un altro fattore importante nella classificazione degli oociti è la presenza delle cellule del cumulo che svolgono, infatti, un ruolo fondamentale nella maturazione del gamete. Queste cellule sono importanti anche durante la fecondazione perché svolgono le funzioni di attrarre e selezionare gli spermatozoi (Chian et al., 1996; Cox et al., 1993), di facilitare i processi di capacitazione spermatica, reazione acrosomiale e penetrazione della cellula uovo (Cox et al., 1993; Fukui, 1990) e di prevenire un precoce indurimento della zona pellucida (Katska et al., 1989). Pertanto in base all'omogeneità del citoplasma e al numero di strati di cellule del cumulo gli oociti sono stati classificati in diverse categorie (Wurth et al., 1992; Wurth et al., 1994; Boni et al., 2002). Dopo la fase di recupero si procede con la selezione degli oociti di buona qualità, che secondo la nostra valutazione morfologica prevede la seguente classificazione (Bakri et al., 2016):

GRADO A: oociti con citoplasma omogeneo e ricoperti da 5 o più strati di cellule del cumulo;

GRADO B: oociti con citoplasma omogeneo e circondati da 2 o quattro strati di cellule del cumulo;

GRADO C: oociti poche circondati da meno di due strati di cellule del cumulo, o parzialmente denudati;

GRADO D: oociti degenerati;

ESPANSI: oociti caratterizzati da cellule del cumulo espanse e picnotiche.

Gli oociti di grado A e B (Figura 1.1) sono quelli scelti per la successiva fase di IVEP. Tale classificazione rispecchia la competenza degli oociti allo sviluppo, dato che l'efficienza IVEP decresce progressivamente quando si passa da oociti di grado A a quelli di grado E.



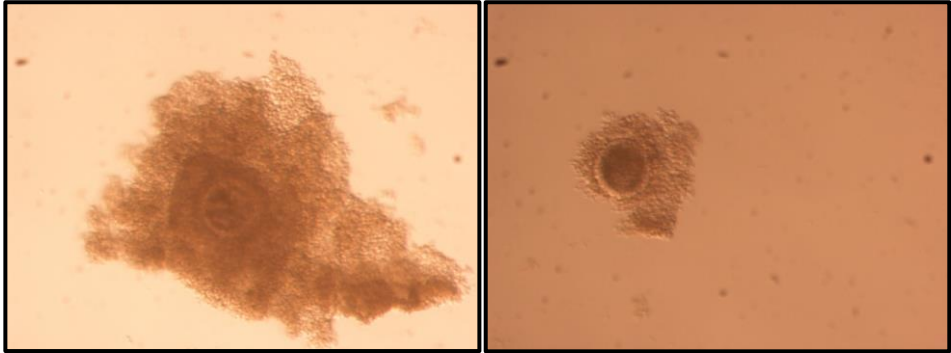


Fig. 1.1 Oocita bovino di grado A e B

### 1.3.2 Maturazione *in vitro*

Ai fini di una buona produzione embrionale *in vitro* è necessario un opportuno sistema di maturazione *in vitro*. Per comprendere l'importanza di questa fase è bene ricordare, almeno in linee generali, come questi eventi si svolgono nell'animale *in vivo*. Lo sviluppo dei follicoli antrali è caratterizzato da due fasi: la prima non strettamente dipendente dagli ormoni gonadotropi (LH e FSH), e la seconda dove il ruolo delle gonadotropine risulta fondamentale al fine di ottenere una corretta maturazione. Oltre alle gonadotropine, nel processo di follicologenesi sono molto importanti i fattori di crescita, che hanno il compito di regolare la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza delle cellule follicolari, anch'esse indispensabili in questa fase; infatti, si può senza dubbio dire che la maturazione è fortemente influenzata dall'interazione esistente tra l'oocita, le cellule somatiche e l'ambiente follicolare. Dal punto di vista nucleare, l'oocita immaturo presente nel follicolo è fermo nella Profase della prima divisione meiotica, a causa dell'inibizione dell'ambiente follicolare, fino al momento in cui non si ha il picco preovulatorio di LH. Nel follicolo antrale, il picco di LH induce nell'oocita, da una parte, la ripresa della meiosi, e dall'altra una serie di modificazioni citoplasmatiche e di membrana; in realtà, la sensibilità al LH dipende dalle dimensioni del follicolo. Infatti, in quelli con diametro inferiore a 8 mm, le cellule della granulosa non sembrano possedere i recettori per LH (Nogueira et al., 2007); al contrario, nei follicoli con diametro superiore a 8 mm, le stesse cellule sono in grado di recepire e, quindi, di rispondere al picco di LH in quanto, soltanto a questo stadio, si è avuta una corretta maturazione e modificazioni nelle giunzioni

intracellulari che, consentendo la diffusione di molecole di segnale dal compartimento somatico all'oocita, innescano la progressione meiotica per cui si passa da un nucleo in Profase I ad uno in Metafase II (MII). Diversi esperimenti sono stati fatti in passato (Boni et al., 1992; Neglia et al., 2001) allo scopo di trovare parametri validi per la corretta misurazione dell'avvenuta maturazione, ma è importante precisare che mentre la maturazione nucleare risulta facilmente valutabile, quella citoplasmatica sembra più difficile da stimare. Per questo motivo si è cercato di trovare altre caratteristiche a cui affidarsi in maniera da rendere possibile la valutazione dell'avvenuta maturazione senza dover ricorrere ad indagini ultrastrutturali, e a questo scopo ben si presta l'analisi dell'espansione delle cellule del cumulo, anche se in alcuni casi, nel bovino, non è stata osservata una diretta correlazione tra questo parametro e la maturazione oocitaria. In vivo il completamento della maturazione può essere considerato come quel segnale capace di innescare l'ovulazione, che altrimenti non si verificherebbe impedendo così l'espulsione dell'oocita dal follicolo. Infatti solo gli oociti in MII, e quindi maturi, sono in grado di essere fecondati e di dare eventualmente il via a quella serie di trasformazioni che porteranno, dalla fusione di due singole cellule (aploidi), alla formazione di un unico organismo complesso (diploide): l'embrione. A tal proposito è stato fondamentale stabilire il tempo di permanenza degli oociti nel terreno di maturazione, e la composizione più corretta di questi media affinché si raggiungesse una valida maturazione nucleare e citoplasmatica degli oociti immaturi prelevati sia mediante OPU, sia per aspirazione follicolare da ovaie da macello. Hunter et al. (1972) hanno effettuato studi sull'IVM di oociti bovini, e da allora si è sempre cercato di creare un terreno che mimasse le condizioni naturali per lo sviluppo della cellula uovo. I media per l'IVM, che devono cercare di simulare l'ambiente follicolare, sono generalmente composti da un terreno commerciale complesso, il Tissue Culture Medium 199 (TCM 199), addizionato con una percentuale variabile di siero fetale bovino (FCS), che apporta proteine, fattori di crescita e previene l'indurimento della zona pellucida (ZP), che altrimenti ostacolerebbe la fecondazione. Tra i vari fattori del siero vi è il glucosio, che ha un ruolo molto importante nella maturazione, dato che in sua assenza gli oociti riprendono la meiosi, ma non riescono a raggiungere la metafase II (Kimura et al., 2008). Sebbene la maturazione degli oociti in vitro possa essere ottenuta anche senza l'aggiunta di ormoni (Madan et al., 1994), la loro presenza (gonadotropine e estradiolo) nei media di IVM consente sia una più idonea maturazione che una migliore fecondazione (Totey et al.,

1992; 1993a). Qualche volta vengono aggiunti anche dei fattori di crescita come, ad esempio, il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) (Majerus et al., 1999; Mermillod et al., 1993) che addizionato al medium di coltura, permette di utilizzare per l'IVM anche oociti di animali giovani (3-4 mesi di età) che hanno una più bassa competenza allo sviluppo embrionale in vitro (Khatir et al., 1998). Altro fattore che è stato osservato migliorare l'efficienza dell'IVM è l'aggiunta di cisteamina, in grado di aumentare la sintesi di glutatione (GSH) che è il principale composto sulfidrilico che ha, sia in vivo che in vitro, un importante ruolo protettivo nei confronti dello stress ossidativo (Meister, 1976), uno dei maggiori fattori che influenzano negativamente lo sviluppo di embrioni di mammifero. Il mix finale deve essere un terreno che permetta agli oociti di raggiungere la maturazione nucleare e citoplasmatica, considerando che si aspirano oociti immaturi, da follicoli con un diametro compreso tra i 2 e gli 8 mm.

Bisogna tenere presente che l'oocita risente molto dell'ambiente in cui si sviluppa; quindi la maturazione degli oociti in vitro è condizionata da specifiche condizioni fisiche dell'ambiente di coltura e da altre condizioni non ben definite (Holm e Callesen, 1998). L'osmolarità (Yamauchi et al., 1999), la composizione ionica, la temperatura (Lenz et al., 1983), il pH, la CO<sub>2</sub> (Geshi et al., 1999), e la tensione di ossigeno, così come, il rapporto tra il numero di oociti e il volume di medium, la presenza/assenza di siero e delle cellule somatiche sono tutti fattori che influenzano l'IVM (Gordon, 1994).

Un altro fattore fondamentale da considerare è la tempistica della maturazione e, quindi il tempo che i COC devono permanere nel medium di IVM. La durata della maturazione in vitro può giocare un ruolo critico per lo sviluppo successivo; infatti un inappropriato tempo di maturazione può determinare l'invecchiamento degli oociti (Hunter, 1989; Hunter e Greve, 1997) e può causare una riduzione dello sviluppo (Chang et al, 1964). Sebbene gli spermatozoi possono penetrare gli oociti prima del completamento della maturazione (Chian et al., 1992; Niwa et al., 1991), il successivo sviluppo è generalmente ridotto e, quindi, sembra che il momento ottimale per l'IVF sia a maturazione ultimata. È noto che il tempo necessario per il completamento della maturazione in vitro può variare tra le specie, in particolare, nel bovino è compreso tra le 18 e le 24 ore (Sirard et al., 1989; Neglia et al, 2001). In condizioni ottimali di coltura più del 90% degli oociti raggiunge la metafase II.

### 1.3.3 Fecondazione *in vitro*

La fecondazione *in vitro* è lo step successivo alla maturazione e consiste nell'incontro, ovvero nella co-incubazione dei due gameti, maschile e femminile. La fecondazione è un processo complesso, che porta all'unione dei due gameti, riportando il numero dei cromosomi somatici, cui segue l'inizio dello sviluppo embrionale. In natura il rapporto oocita spermatozoo è 1:1 mentre *in vitro* il rapporto è almeno di 1:10000 (Ward et al., 2002) e questo può portare ad un incremento della polispermia rispetto ad una situazione fisiologica. *In vivo* lo spermatozoo prima di entrare in contatto con la cellula uovo subisce una serie di modificazioni biochimiche che lo preparano alla fecondazione. Tutte queste trasformazioni biologiche avvengono a livello del tratto riproduttivo femminile, dove, mediante il processo di capacitazione, gli spermatozoi acquisiscono la capacità fecondante (Yanagimachi, 1994). La capacitazione è associata alla fosforilazione di alcune proteine tirosiniche (Visconti et al., 1995; 1998), che è regolata in molte specie, compreso il bovino (Galantino-Homer et al., 1997), dall'AMP ciclico, ed è condizionata da diversi elementi di trasduzione del segnale che coinvolgono la proteina chinasi A (PKA) (Leclerc et al., 1996). L'AMP ciclico è generato dall'enzima adenilato ciclasi (AC). Non potendo utilizzare *in vitro* il tratto genitale femminile, si è cercato nel tempo di individuare dei meccanismi chimici e fisici per indurre la capacitazione *in vitro*. Dagli anni 80' ad oggi diversi approcci sono stati tentati in questa direzione in numerosi centri di ricerca, dall'utilizzo di agenti chimici fino a quelli biologici quali la forza ionica (Brackett et al., 1982), il fluido follicolare (Fukui et al., 1983), l'eparina (Parrish et al., 1984) ed altri ancora come la caffeina, il bicarbonato e l'adenosina (Breininger et al., 2010). Il metodo d'elezione rimane, ancora oggi, l'impiego di eparina in presenza di  $Ca^{++}$  extracellulare. Inoltre, affinché si inneschi la capacitazione spermatica, è necessario l'efflusso di colesterolo dalla membrana plasmatica dello spermatozoo. A tal proposito, l'albumina sierica bovina (BSA) può essere aggiunta al terreno di fecondazione perché funge da accettore di colesterolo. Per l'IVF si può utilizzare sia seme fresco che congelato a seconda dell'esperimento e delle possibilità del centro; il seme congelato però deve essere lavorato prima di co-incubarlo con i gameti femminili (Galli et al., 1996; Henkel et al., 2003). Questa manipolazione del seme congelato è fondamentale almeno per due motivi: l'eliminazione dei crioprotettori, importanti per la crioconservazione ma allo stesso tempo tossici a temperatura ambiente, e la separazione degli

spermatozoi vivi da quelli morti. Le tecniche attualmente in uso nei laboratori di produzione embrionale per la preparazione del seme sono molte e tra queste possiamo includere lo swim-up, i gradienti percoll e il semplice lavaggio in centrifuga (Machado et al., 2009); non c'è una sostanziale differenza nella percentuale di oociti fecondati (Dode et al., 2002) e nella successiva resa embrionale, intesa come quantità e qualità degli embrioni prodotti (Avery et al., 1995). Di questi tre, il più utilizzato a livello mondiale, data la sua praticità e perché risente in minor misura dell'effetto toro, è il protocollo dei gradienti percoll (Cesari et al., 2006). Quest'ultimo è però meno selettivo dello swim-up, perché non in grado di selezionare gli spermatozoi vivi mobili da quelli non mobili. La concentrazione della dose fecondante da utilizzare normalmente nella specie bovina è di 106 per ml, ma può variare in base alla qualità del seme utilizzato; quindi, prima di poter utilizzare un nuovo toro, è necessario testare diverse concentrazioni del seme e scegliere quella che ha dato le percentuali più alte di fecondazione con il più basso grado di polispermia. Inoltre, oltre ad aggiungere l'agente capacitante al terreno di fecondazione vengono aggiunte delle sostanze che hanno la capacità di migliorare la motilità e la capacità fecondante del seme come, ad esempio, il complesso penicillamina, ipotaurina ed epinefrina. La penicillamina quando usata in presenza di epinefrina è in grado di aumentare la percentuale di spermatozoi che vanno incontro alla reazione acrosomiale (Monaco, 2007). L'ipotaurina, aumenta la motilità spermatica e, in combinazione con l'adrenalina, è responsabile di un aumento della percentuale di penetrazione oocitaria (Monaco, 2007). Negli ultimi anni per cercare sempre di più di mimare l'ambiente tubarico, si è iniziato a produrre dei media definiti continui, perché la base del terreno dalla fecondazione alla fine della coltura è uguale ma i substrati energetici e gli ioni cambiano man mano che l'embrione si sviluppa. Il terreno più comunemente utilizzato, nei protocolli che utilizzano terreni diversi, per l'IVF è il "Tyrode's modified medium" (Talp; Parrish et al., 1984) con l'aggiunta di bicarbonato di sodio e substrati energetici mentre il Synthetic Oviductal fluid (SOF) è quello utilizzato in quei protocolli che utilizzano la stessa base per fecondazione e coltura nei protocolli dinamici. Lazzari et al. (1999) hanno messo a confronto il Talp con il SOF ed è risultato che la qualità degli embrioni al giorno 7 era significativamente superiore per gli oociti che erano stati fecondati in SOF supplementato con aminoacidi essenziali (EAA) e non (NEAA), glutammina e glicina. Tra i fattori che possono condizionare l'IVF ricordiamo la competenza degli oociti, la presenza delle cellule del cumulo, il tempismo nell'intervento fecondativo, la concentrazione spermatica, la

proporzione oociti-spermatozoi, la durata di co-incubazione dei gameti e, ovviamente la qualità del seme utilizzato. A quest' ultimo riguardo, è noto che i tori differiscono tra loro per la capacità di fecondare gli oociti in vitro (Hillery et al., 1990; Shi et al., 1990); è stato osservato che una certa percentuale di tori (<5%) ha delle performance veramente molto basse anche dopo iniezione intracitoplasmatica di sperma (Wei e Fukui, 1999). Inoltre è sicuramente da sottolineare l'importanza delle cellule del cumulo, in quanto è stato dimostrato che sia il cleavage che lo sviluppo embrionale successivo risultano nettamente inferiori in assenza di queste. Ward et al., (2002) hanno riportato che nel bovino l'optimum, inteso come il tempo sufficiente di co-incubazione dei gameti per la massima resa embrionale, è di 10 h e simili risultati sono stati ottenuti poi da altri autori (Long et al., 1994; Rehman et al., 1994). Nella specie bovina, le variazioni di fertilità tra i singoli tori nonché tra i diversi eiaculati del toro stesso sono stati segnalati sia per l' IS che per l'IVF (Hillery et al., 1990; Shi et al., 1991; Otoi et al., 1993; Kreising et al., 1997; Zhang et al., 1999; Palma e Sinowatz, 2004; Alomar et al., 2006). Non è detto che un toro che presenti i migliori requisiti morfologici e genetici abbia un seme altamente fertile, o che la sua fertilità sia uguale in campo come in vitro. Questo problema è fortemente limitante nei rapporti tra laboratori di produzione embrionale ed i privati; normalmente l'allevatore sceglie il seme su cataloghi che presentano tutte le caratteristiche della progenie ma, difficilmente sono riportate le percentuali di fertilità in vitro. Inoltre, è importante sottolineare che anche tutte le procedure del processo di crioconservazione (diluizione, raffreddamento, congelamento/scongelo) degli spermatozoi possono influenzare negativamente la qualità del materiale seminale alterando la funzionalità spermatica e riducendo la capacità fecondante (Aziz et al. 2004). Gli spermatozoi sono molto vulnerabili allo stress ossidativo indotto dalla crioconservazione a causa del limitato sistema di protezione antiossidante intrinseco e dell'alto contenuto di acidi grassi polinsaturi nella membrana plasmatica (Aitken et al., 2016). Lo stress ossidativo causa la frammentazione del DNA spermatico e il danneggiamento delle proteine e dei lipidi nella membrana plasmatica dello spermatozoo (Aitken et al., 2014). Inoltre lo stress indotto dai radicali liberi dell'ossigeno indice la capacitazione, la reazione acrosomiale e l'apoptosi limitando di fatto la capacità fecondante degli spermatozoi (Agarwal et al., 2003, Aitken et al., 2016). Ad oggi, sono state sviluppate diverse strategie per ridurre il danno mediato dai radicali liberi agli spermatozoi (Bucak et al., 2007, Bucak et al., 2009). Tra questi, l'aggiunta esogena di antiossidanti sotto forma di enzimi,

vitamine e aminoacidi agli extender è stata sperimentata in diversi studi per migliorare la qualità post-scongelo degli spermatozoi di bovino (Bucak et al., 2007, Gadea et al., 2008), cinghiale (Uysal et al., 2007), suino (Gadea et al., 2005, Satorre et al., 2007, Funahashi and Sano, 2005) e bufalo (Longobardi et al. 2017a, 2017b).

### *1.3.4 Coltura in vitro*

L'attivazione della cellula uovo consiste in una serie di eventi successivi alla fecondazione che hanno lo scopo di preparare la cellula stessa ad iniziare la sua attività di zigote. Lo sviluppo embrionale è un processo estremamente complesso che avviene sotto lo stretto controllo del patrimonio genetico ma che è anche influenzato da fattori ambientali. Infatti, affinché vi sia una corretta progressione degli eventi è necessario che ad ogni singolo stadio l'embrione trovi le opportune condizioni che ne permettano la progressione verso lo stadio successivo. L'embriogenesi nella fase del pre-impianto consta di due fasi: precoce e tardiva. Nella prima fase gli embrioni, che si trovano nell'ovidutto, sono entità indifferenziate, non vascolarizzate, che si dividono ripetutamente senza, però, mostrare accrescimento (Turner et al., 1992). In questa fase, gli embrioni non sono sensibili ad ormoni ed a fattori di crescita e sono sotto il controllo genetico materno poiché non si è ancora attivato il genoma embrionale (Tesarik, 1993). L'ambiente uterino si modifica gradualmente per poter accogliere l'embrione che vi giunge, dopo le sue prime divisioni cellulari nell'ovidutto, dove permane mediamente per 3-5 giorni, superando la giunzione utero tubarica. Prima del passaggio dell'embrione in utero, i livelli ematici di progesterone si innalzano come conseguenza del progredire del processo di luteinizzazione e, sotto l'influsso di questo ormone, l'endometrio si prepara a ricevere l'embrione (Stabenfeldt and Edqvist, 2002). Nella fase tardiva di sviluppo, che coincide con il passaggio nell'utero, invece, gli embrioni non sono più elementi indifferenziati, in quanto si osserva la formazione del primo epitelio embrionale, il trofotoderma, e del nodo embrionale. Inoltre, in questa fase gli embrioni si accrescono e sono più responsivi agli ormoni e ai fattori di crescita. Il controllo genetico dello sviluppo si attribuisce al genoma embrionale e l'attività metabolica aumenta notevolmente con l'evolversi, fino allo stadio di blastocisti. Ad oggi molti studi sono stati effettuati per ottimizzare il sistema di coltura in vitro e nonostante sia possibile coltivare in vitro embrioni di diverse specie fino allo stadio trasferibile, allo stato attuale l'ambiente materno rimane insostituibile. È noto che il fattore



principale che determina la resa in blastocisti è la qualità dell'oocita, tuttavia la composizione dei media di coltura in vitro, in cui sono esposti gli embrioni dopo la fecondazione, può influenzare la qualità dell'embrione (Abe et al., 2002; Rizos et al., 2003). Le condizioni di coltura inadeguate si ripercuotono negativamente anche sugli eventi post-impianto, infatti gli embrioni prodotti in vitro rispetto a quelli in vivo sono meno vitali e meno resistenti alla crioconservazione e mostrano differenze sia a livello cellulare (Boni et al., 1999) sia a livello di espressione genica (Miles et al., 2008). Negli ultimi cinquant'anni, sono stati sviluppati numerosi protocolli che includono vari tipi di co-colture così come sistemi privi di cellule e procedure di coltura in vivo nell'ovidutto di pecora (Galli and Lazzari 1996; Eyestone et al., 1987). In quest'ultimo caso, la qualità degli embrioni è risultata paragonabile a quella degli embrioni ottenuti con i programmi MOET, confermando che l'ovidutto ovino fornisce un sito adeguato per la coltura embrionale; tuttavia questa tecnica è risultata essere poco pratica, dispendiosa e poco accettabile da un punto di vista etico. Inoltre, Gandolfi and Moor (1987) impiegarono per la prima volta con successo nell'IVC ovina e suina sistemi di co-coltura utilizzando monostrati di cellule oviduttali. L'introduzione delle co-colture di embrioni con cellule somatiche è stata una tappa importante perché ha permesso di superare il problema dell'arresto dello sviluppo embrionale bovino a 8-16 cellule (Eyestone et al., 1989). Tuttavia, diversi sono gli svantaggi di questo sistema poiché richiede la gestione di cellule soggette a variazioni biologiche ed implica l'uso di terreni complessi, che non permettono ai ricercatori di avere un sistema di coltura definito che faciliti lo studio della fisiologia embrionale. Una svolta importante, nel campo della produzione embrionale in vitro, è stata data dalla formulazione del primo medium di coltura semi-definito, il SOF (Keskinetepe et al., 1995; Tervit et al., 1972), che ha consentito di ottenere numerosi successi nella coltura in vitro di embrioni bovini ed ovini. È ormai diventato evidente che per migliorare il sistema di coltura in vitro, è necessario basarsi sulle caratteristiche dell'ambiente tubarico per formulare dei sistemi di coltura in vitro definiti. È noto che non tutti i componenti presenti in un terreno di coltura sono necessari per lo sviluppo embrionale che può avvenire ugualmente per la capacità che ha l'embrione di adattarsi a condizioni non fisiologiche, anche se a scapito della vitalità. Ad esempio, l'assenza di aminoacidi nel media di coltura porta comunque allo sviluppo completo dell'embrione dallo zigote alla blastocisti e alla nascita di vitelli dopo trasferimento embrionale (Whitten e Biggers, 1968; Whittingham, 1971; Fissore et al., 1989). Pertanto, gli aminoacidi non possono essere



classificati come componenti assoluti di un terreno di coltura degli embrioni. Inoltre, gli embrioni all'interno del tratto femminile sono esposti a una varietà di macromolecole, come l'albumina e i glicosaminoglicani. L'albumina è la proteina più abbondante nel tratto femminile (Leese, 1988) e svolge un ruolo fondamentale eliminando gli effetti delle tossine ed è importante anche per la pressione osmotica colloidale (Palasz et al., 2000). In vitro l'albumina può essere sostituita dai glicosaminoglicani ialuronidati (acido ialuronico; Gardner et al., 1999), che insieme ai proteoglicani sono importanti componenti del liquido oviduttale. Inoltre, l'aggiunta di acido ialuronico nel terreno di coltura è stata associata al mantenimento della struttura embrionale e ad un aumento della criotolleranza degli embrioni in varie specie, quali la pecora, la vacca, la bufala, il topo e l'uomo (Gardner et al., 1999; Stojkovic et al., 2002; Lane et al., 2003; Balaban e Urman, 2005; Palasz et al., 2006, Boccia et al., 2012). Una variazione (per eccesso o per difetto) entro certi range delle concentrazioni degli ioni, invece, non viene avvertita come tossica, mentre una variazione della concentrazione delle macromolecole può essere fatale per lo sviluppo embrionale (McEvoy et al., 1997; Gardner et al., 2004; He et al., 2007). Nel tratto riproduttivo femminile l'embrione è in contatto con le cellule epiteliali dell'ovidutto e dell'utero ed, essendo un ambiente molto dinamico, queste cellule epiteliali modificano costantemente l'ambiente in cui l'embrione è esposto e sono anche in grado di rimuovere le tossine e i cataboliti prodotti dall'embrione attraverso la circolazione materna, come lo ione ammonio, noto per essere tossico per le colture embrionali (McEvoy et al., 1997; Gardner et al., 2004; He et al., 2007). Inoltre, nel tratto femminile sono presenti carboidrati (Gardner et al., 1996; Harris et al., 2005) e aminoacidi (Harris et al., 2005; Hugentobler et al., 2007), coinvolti nella regolazione e nella produzione di energia durante lo sviluppo embrionale. È noto che il fabbisogno energetico varia in funzione dello stadio di sviluppo dell'embrione; infatti, il glucosio fonte energetica delle cellule somatiche di mammifero, può essere dannoso per gli embrioni di diverse specie durante le fasi di divisione precoce (Schini e Bavister, 1988; Seshagiri e Bavister, 1989; Thompson et al., 1992. Kim et al., 1993; Gutierrez-Ad'an et al., 2001; Larson et al., 2001; Peippo et al., 2001; Scott e Whittingham, 2002; Kwun et al., 2003), mentre è necessario nella fase tardiva. Nella fase di attivazione del genoma embrionale fino allo stadio di blastocisti, infatti, il glucosio è la principale fonte di energia per la compattazione e blastulazione (Gardner, 1998; Khurana e Niemann, 2000), mentre il piruvato e il lattato sono le principali fonti di energia dallo stadio di 8 cellule fino a quello di 16 cellule (Leese e Barton, 1984). Un altro

fattore, che incide sulla resa embrionale è l'effetto di gruppo perché quando i presunti zigoti sono coltivati in gruppo secernono fattori embriotropici, che agiscono in modo autocrino-paracrino (Gardner e Lane, 2000) e che influiscono positivamente sullo sviluppo embrionale rispetto agli embrioni coltivati individualmente (Hendriksen et al., 1999; Gardner e Lane, 2000). Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato che gli embrioni di bovini prodotti in vitro differiscono da quelli in vivo. Queste differenze includono la cronologia di sviluppo, le alterazioni morfologiche (Boni et al., 1999), il metabolismo (Khurana e Niemann, 2000), l'integrità della zona pellucida (Duby et al., 1997), la criotolleranza (Leibo e Loskutoff, 1993), l'espressione genica (Niemann e Wrenzycki, 2000) e le percentuali di gravidanza (Hasler, 2000). Gli embrioni prodotti in vitro si sviluppano più lentamente rispetto a quelli in vivo, (Grisart et al., 1994; Hyttel et al., 1989) e le morule prodotte in vitro hanno un minore grado di compattazione, un aspetto granuloso ed un ridotto spazio perivitellino (Van Soom et al., 1992). Inoltre le blastocisti sviluppate in presenza di siero sono più scure per la presenza di granuli e gocce lipidiche. L'accumulo dei lipidi è probabilmente imputabile ad un'insufficiente funzione mitocondriale; sembra, infatti, che l'attività mitocondriale sia parzialmente compromessa negli embrioni in vitro (Monaco, 2007) che hanno anche una minore resistenza al congelamento/scongelo rispetto a quelli prodotti in vitro. È stato dimostrato ampiamente che queste differenze sono dovute alle modalità di coltura in vitro; infatti, migliorando i sistemi di coltura si potrebbe aumentare la criotolleranza degli embrioni. Nonostante i progressi ottenuti in questo campo, le percentuali di gravidanza dopo trasferimento di questi embrioni sono inferiori (Hasler et al., 1995; Looney et al., 1994). Pertanto, ottimizzare il sistema di coltura in vitro è un'esigenza poiché un sistema di coltura sub-ottimale comporta una minore vitalità degli embrioni prodotti e, di conseguenza, peggiore resistenza al congelamento, elevata incidenza di riassorbimenti embrionali e morte fetale. Ciò è dovuto al fatto che questi sistemi colturali non riescono a mimare l'ambiente tubarico/uterino, perché come precedentemente detto, in natura l'ambiente in cui si sviluppa l'embrione è in continua trasformazione e si adatta rispondendo ai mutamenti creati dall'embrione; c'è un rapporto diretto tra l'ambiente e l'embrione nello scambio di nutrienti e cataboliti e questo fa sì che non ci sia un accumulo di entrambi. La possibilità di potenziare gli attuali sistemi di IVEP, con il conseguente ottenimento di embrioni di migliore qualità, consente di incrementare l'efficienza delle tecniche di crioconservazione embrionale, requisito fondamentale affinché tali

procedure abbiano successo. Proprio per questo motivo la vitalità degli embrioni dopo congelamento/scongelo viene spesso presa come parametro di riferimento per valutare l'efficienza di un laboratorio di produzione embrionale in vitro.

- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H; 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum containing media. *Mol Reprod Dev*; 61:57–66.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA; 2003 Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction *Fertil. Steril.* 79 :829-843.
- Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P; 2016 Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 28: 1–2 1-10.
- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN; 2014. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J. Androl.* 16;1 31-38.
- Alomar M, Mahieu J, Verhaeghe B, Defoin, L, Donnay I: 2006. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 18: 395–402.
- Avery B, Greve T; 1995. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology.* 44(6):871-8.
- Aziz N , Saleh RA , Sharma RK; 2004. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index . *Fertil. Steril.*, 81:2 349-354.
- Bakri NM, Ibrahim SF, Osman NA, Hasan N, Jaffar FH, Rahman ZA, Osman K; 2016. Embryo apoptosis identification: Oocyte grade or cleavage stage? *Saudi J Biol Sci.* 23(1):S50-5.
- Balaban B, and Urman B; 2005. Comparison of two sequential media for culturing cleavage-stage embryos and blastocysts: embryo characteristics and clinical outcome. *Reprod. Biomed. Online* 10: 485–491.
- Baruselli PS, Bernardes O, Braga DPAF, De Araujo berber C, Tonhati H; 2001a. Calving distribution throughout the year in buffalo raised all over Brazil. *Proceedings of the Sixth World Buffalo Congress, Maracaibo, Venezuela*, 234-239.
- Baruselli PS, de Sa Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bo GA; 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*; 65 (1): 77-88.
- Boccia L, De Blasi M, Zullo G, Longobardi V, Vecchio D and Gasparini B; 2012. L-carnitine during in vitro culture enhances the cryotolerance of buffalo (*bubalus bubalis*) in vitro-derived embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 25(1) 214-214.

- Bondoc O L, Smith C, and Gibson JP; 1989. A review of breeding strategies for genetic improvement of dairy cattle in developing countries *Animal Breeding Abstract*. 57:819-829.
- Boni R, Cuomo A, Tosti E; 2002. Developmental Potential in Bovine Oocytes Is Related to Cumulus-Oocyte Complex Grade, Calcium Current Activity, and Calcium Stores. *Biol. Reprod.* 66, 836–842.
- Boni R, Roviello S, Barbieri V, Zicarelli L; 1994b. In vitro embryo production in buffalo species. *Atti XLVIII Convegno Nazionale SISVET*. 1:307-312.
- Boni R, Roviello S, Gasparrini B, Langella M, Zicarelli L; 1999. In vitro production of buffalo embryos in chemically defined medium. *Buffalo J.* 1:115-120.
- Boni R, Roviello S, Gasparrini B, Langella M, Zicarelli L; 1999. In vitro production of buffalo embryos in chemically defined medium. *Buffalo J.* 1:115-120.
- Boni R, Santella L, Dale B, Roviello S, Di Palo R, Barbieri VM; 1992. An ultrastructural study of maturation in buffalo oocytes. *Acta Medica Veterinaria*. 38: 153-161.
- Boni, R, Di Palo R, Barbieri V, Zicarelli L; 1994. Ovum pick-up deep anestrous buffaloes. *Proc. IVth World Buffalo Congress*. 3: 480-485.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, and Dressel MA; 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow *Biol Reprod.* 27:147-158.
- Breiner E, Cetica PD, Beconi MT; 2010. Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. *Theriogenology*. Oct 1;74(6):1036-49.
- Bucak MN, Sariozkan S, Tuncer PB, Ulutaş PA, Akçadag HI; 2009. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Rum. Res.* 81:90-95.
- Bucak MN, Tuncer PB, Sariozkan S, Basimar N, Taipınar M, Cayan K, Bilgili A, Akalin PP, Buyukleblebici S, Aydos S, Ilgaz S, Sunguroglu A, Oztuna D; 2007. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*. 61:248-253.
- Campanile G, Baruselli PS, Neglia G, Vecchio D, Gasparrini B, Gimenes LU, Zicarelli L, D'Occhio MJ; 2010. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 121(1-2) : 1–11.

- Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW, Alberio RH; 2006. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology*. 66(5):1185-93.
- Chastant-Maillard S, Quinton H, Lauffenburger J, Cordonnier A, Lefort N, Richard C, Marchal J, Mormede P, and Renard JP; 2003. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows *Reproduction*. 125:555-563.
- Chian RC, Park CK, Sirard M; 1996. Cumulus cells act as a sperm trap during in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1 (45), 258.
- Cox JF, Hormazabal J, Santa Maria A; 1993. Effect of the cumulus cells on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology*. 40:1259-67.
- Dode MA, Rodvalho NC, Ueno VG, Fernandes CE; 2002. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes.. *Anim Reprod Sci*. 69(1-2):15-23.
- Duby R, Hill J, O'Callaghan D, Overstrom E, Boland M; 1997. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology*. 47:332.
- Fissore RA, Jackson KV and Kiessling AA; 1989. Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid. *Biol. Reprod*. 41, 835-841.
- Fukui Y, Fukushima M and Ono H; 1983. Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation in vitro *J Exp Zool*. 226(1):137-42.
- Fukui Y; 1990. Effect of follicle cells on acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev*. 26 :40-6.
- Funahashi H, Sano T; 2005. Selected antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 °C. *Theriogenology*. 63: 1605-1616.
- Gadea J, Francisco GV, Carmen MS, Juan CGN, Sebastia NCN, David G; 2005. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function *J. Androl*. 26:396-404.
- Gadea J, Gumbao D, Canovas S , Garcia-Vazquez FA, Grullon LA, Gordan JC; 2008. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa *Int. J. Androl*. 31:40-49.

- Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS; 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod.* 56: 707-19.
- Galli C and Lazzari G; 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* 42:371-379.
- Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G; 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology.* 81(1):138-51.
- Gandolfi F and Moor RM; 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod Fertil.* 81:23-28.
- Garcia A and Salaheddine M; 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology.* 50:575-585.
- Gardner DK, Lane M, Calderon I, and Leeton J; 1996. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil. Steril.* 65, 349-353.
- Gardner DK, Lane M; 2000. Embryo culture systems. In: Trounson AO, Gardner DK, editors. *Handbook of in vitro fertilization* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 558.
- Gardner DK, Rodriguez-Martinez H and Lane M; 1999. Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum. Reprod.* 14, 2575-2580.
- Gardner DK, Stillely K and Lane M; 2004. High protein diet inhibits inner cell mass formation and increases apoptosis in mouse blastocysts developed in vivo by increasing the levels of ammonium in the reproductive tract. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 190. [Abstract]
- Gardner DK; 1998. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology.* 49:83-102.
- Geshi M, Yonai M, Sakaguchi M and Nagai T; 1999. Improvement of in vitro co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with beta-mercaptoethanol. *Theriogenology.* 51:551-558.

- Gordon I and Persley In GJ; 1994. [ed.], Laboratory production of cattle embryos. 170-226.
- Grisart, B., A. Massip, and F. Dessy; 1994. Cinematographic Analysis of Bovine Embryo Development in Serum-Free Oviduct-Conditioned Medium. *Journal of Reproduction and Fertility*. 101:257-264.
- Gutierrez-Adan A and De la Fuente, J; 2006. Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo in vitro development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 1503–1511.
- Hanenberg, EHAT and van Wagendonk-de Leeuw AM; 1997. Comparison of 3, 4 or 7 day interval between oocytes effects of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 47, 158. Abstract
- Harris SE, Gopichandran N, Picton H M, Leese H J, and Orsi NM; 2005. Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology*. 64, 992–1006.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, Mccauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, and Trimmer SA; 1995. Production, Freezing and Transfer of Bovine Ivf Embryos and Subsequent Calving Results. *Theriogenology*. 43:141-152.
- Hasler JF; 2000. In vitro culture of bovine embryos in Menezo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Animal Reproduction Science* 60:81-91.
- Hasler JF; Bilby CR; Collier RJ; Denham SC; Lucy MC; 2003. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. *59(9):1919-28*.
- He Y, Hakvoort TB, Vermeulen JL, Lamers WH, and Van Roon MA; 2007. Glutamine synthetase is essential in early mouse embryogenesis. *Dev. Dyn.* 236, 1865–1875.
- Hendriksen PJM, Bevers MM, Dieleman SJ; 1999. Single IVP using BRL cell coculture and serum yields a lower blastocyst rate than group culture. *Theriogenology*. 51:319.
- Henkel RR, Shill WB; 2003. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol.* 1:108.
- Hillery FL, Parrish JJ, First NL; 1990. Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology*. 33, 249 (Abstract).
- Holm, P and Callesen H; 1998. In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr. Dev.* 38:579-594.



- Hugentobler SA, Diskin MG, Leese HJ, Humpherson PG, Watson T, Sreenan JM and Morris DG; 2007. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 445–454.
- Hunter RH, Lawson RA and Rowson LA; 1972. Maturation, transplantation and fertilization of ovarian oocytes in cattle. *J. Reprod Fertil.* 30:325-328.
- Hunter RHF and Greve T; 1997. Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod. Domest. Anim.* 32, 137–142.
- Hyttel P, Callesen H and Greve T; 1989. A Comparative Ultrastructural Study of In vivo Versus In vitro Fertilization of Bovine Oocytes. *Anatomy and Embryology.* 179:435-442.
- Hyttel P, Callesen H and Greve T; 1989. A Comparative Ultrastructural Study of In vivo Versus In vitro Fertilization of Bovine Oocytes. *Anatomy and Embryology.* 179:435-442.
- Jainudeen MR, Takahashi Y, Nihayah M, Kanagawa H; 1993. In vitro maturation and fertilization of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Anim Reprod Sci.* 31: 205-212.
- Janssen-Caspers H.A.B, Wladimiriff J.W, Van Gent I, Alberga A.Th, Leerentveld RA, Zeilmaker GH, Drogendijk AC; 1988. Ultrasonically guided percutaneous and transvaginal follicle aspiration; a comparative study. *Human reproduction.* 3: 337-339.
- Katska L, Kauffold P, Smorag Z, Duschinski V, Torner H, Kanitz W; 1989. Influence of hardening of the zona pellucida on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology.* 32:767–777.
- Keskintepe, L, Burnley CL and Brackett BG; 1995. Production of Viable Bovine Blastocysts in Defined In-Vitro Conditions. *Biology of Reproduction.* 52:1410-1417.
- Khatir H, Lonergan P, Touze JL and Mermillod P; 1998. The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non surgical embryo transfer. *Theriogenology.* 50:1201-1210.
- Khurana NK, Niemann H; 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod.* 62:847–856.
- Khurana NK, Niemann H; 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod.* 62:847–856.
- Kim JH, Niwa K, Lim JM, Okuda K; 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro

- fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol Reprod.* 48:132–135.
- Kimura Koji, Hisataka Iwata, Thompson JG; 2008. The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos *Animal Reproduction Science.* 103 228–238.
- Kreysing U, Nagai T, Niemann H; 1997. Male-dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine in vitro fertilization systems and the effects of casein phosphopeptides (CPPs). *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 465–474.
- Kwun J, Chang K, Lim J, Lee E, Lee B, Kang S, Hwang W; 2003. Effects of exogenous hexoses on bovine in vitro fertilized and cloned embryo development: Improved blastocyst formation after glucose replacement with fructose in a serum-free culture medium. *Mol Reprod Dev.* 65:167–174.
- Lane M, Maybach JM, Hooper K, Hasler JF and Gardner DK; 2003. Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Mol. Reprod. Dev.* 64, 70–78.
- Larson MA, Kimura K, Kubisch HM, Roberts RM; 2001. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9677–9682.
- Lazzari G, Crotti G, Turini P, Notari C and Galli C; 1999. Supplementation of essential and non essential amino acids during IVF improves the quality of bovine embryos fertilised in medium SOF. *Proceeding of the Assoc Eur Trans Embr.* 180. Abstract
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C; 1996. Cyclic adenosine 3=5= monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod.* 55:684–692.
- Leese HJ and Barton AM; 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil.* 72:9–13.
- Leese HJ; 1988. The formation and function of oviduct fluid. *J. Reprod. Fertil.* 82, 843–856.
- Leibo SP, Loskutoff NM; 1993. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 39:81–94.
- Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, and First NL; 1983. In vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes Are Temperature Dependent Processes. *Biology of Reproduction.* 29:173-179.

- Long CR, Damiani P, Pinto-Correira C, MacLean RA, Duby RT, Robl JM;1994. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *J. Reprod Fertil.* 102: 361-369.
- Longobardi V, Salzano A, Campanile G, Marrone R, Palumbo F, Vitiello M, Zullo G, Gasparrini B; 2017a. Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Theriogenology.* 88:236-243.
- Longobardi V, Zullo G, Salzano A, De Canditiis C, Cammarano A, De Luise L, Puzio MV, Neglia G, Campanile, Gasparrini B; 2017b. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology.* 88:1-8.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, and Johnson DL; 1994. Commercial Aspects of Oocyte Retrieval and In-Vitro Fertilization (Ivf) for Embryo Production in Problem Cows. *Theriogenology.* 41:67-72.
- Machado GM, Carvalho JO, Siqueira Filho E, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MAN; 2009. Effect of percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology.* 71, 1289-1297.
- Madan ML, Singla SK, Chauhan MS, Manik RS; 1994. In vitro production and transfer of embryos in buffaloes. *Theriogenology.* 41, 139–143.
- Majerus V, De Roover R, Etienne D, Kaidi S, Massip A, Dessy F, and Donnay I;1999.Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology.* 52:1169-1179.
- Mapletoft RJ, Bó GA; 2014. Superovulation in Cattle. *Bovine reproduction.* Book Editor(s): Richard M. Hopper DVM, Diplomate ACT. 75; 696-702.
- McEvoy TG, Robinson JJ, Aitken RP, Findlay PA and Robertson IS; 1997. Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Anim. Reprod. Sci.* 47, 71–90.
- Meister A and Tate SS; 1976.Glutathione and the related  $\gamma$ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann Rev Biochem.* 45: 559-604.
- Mermillod P, Vansteenbrugge A, Wils C, Mourmeaux JL, Massip A and Dessy F; 1993. Characterization of the Embryotrophic Activity of Exogenous Protein-Free Oviduct-Conditioned Medium Used in Culture of Cattle Embryos. *Biology of Reproduction.* 49:582-587.
- Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL and Dieleman SJ; 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in

- commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 59:651-674.
- Miles JR, Blomberg le A, Krisher RL, Everts RE, Sonstegard TS, Van Tassell CP, et al; 2008. Comparative transcriptome analysis of *in vivo*- and *in vitro*-produced porcine blastocysts by small amplified RNA-serial analysis of gene expression (SAR-SAGE). *Mol Reprod Dev*. 75:976–988.
- Monaco E; 2007. Studio di alcune proteine del fluido oviduttale: effetto dell'osteopontina sulla produzione embrionale *in vitro* nella specie bovina. PhD Thesis Napoli Italia : Federico II
- Neglia G, Marino M, Di Palo R, Wilding M, Caracciolo di Brienza V, Dale B, Gasparrini B, Zicarelli L; 2001. A comparison of *in vitro* maturation in buffalo (*Bubalus Bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. *Theriogenology*. 55: 488.
- Neglia G, Natale A, Esposito G, Salzillo F, Adinolfi L, Campanile G, Francillo M, & Zicarelli L; 2008. Effect of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  at the time of AI on progesterone levels and pregnancy rate in synchronized Italian Mediterranean buffaloes. *Theriogenology*. 69: 953-960.
- Neglia G, Restucci B, Russo M, Vecchio D, Gasparrini, B, Prandi A, Di Palo R, D'Occhio MJ, Campanile G; 2015. Early development and function of the corpus luteum and relationship to pregnancy in the buffalo. *Theriogenology*. 83(6):959-67.
- Niemann H and Wrenzycki C; 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology* 53:21-34.
- Niwa K, Park CK, Okuda K; 1991. Penetration *in vitro* of bovine oocytes during maturation by frozen-thawed spermatozoa. *J. Reprod. Fertil*. 91, 329– 336.
- Nogueira MF, Buratini J Jr, Price CA, Castilho AC, Pinto MG, Barros CM; 2007 Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH *in vitro*. *Mol Reprod Dev*.74(6):680-6.
- Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Suzuki T; 1993. Effects of different lots of semen from the same bull on *in vitro* development of bovine oocytes fertilized *in vitro*. *Theriogenology*. 39, 713–718.
- Palasz AT, Rodriguez-Martinez H, Beltran-Brena P, Perez-Garnelo S, Martinez MF, Gutierrez-Adan A and De la Fuente, J; 2006. Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo *in vitro* development,

- ultrastructure, and gene expression patterns. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 1503–1511.
- Palasz, AT, Thundathil J, Verrall RE and Mapletoft RJ; 2000. The effect of macromolecular supplementation on the surface tension of TCM-199 and the utilization of growth factors by bovine oocytes and embryos in culture. *Anim. Reprod. Sci.* 58, 229–240.
- Palma, G.A., Sinowatz, F; 2004. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. *Anat. Histol. Embryol.* 33, 257–262.
- Parrish JJ, Parrish JL and First NL; 1984. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biology of Reproduction.* 112.
- Peippo J, Kurkilahti M, Bredbacka P; 2001. Developmental kinetics of in vitro produced bovine embryos: The effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. *Zygote.* 9:105–113.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruij TA, Taverne MA; 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30:751-762.
- Rehman N, Collins AR, Suh Tk, Wright Jr RW; 1994. Effect of sperm exposure time on in vitro fertilization and embryo development of bovine oocytes matured in vitro *Theriogenology.* 41:1447-52.
- Rizos D, Gutierrez-Adana, Perez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P; 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod.* 68:236.
- Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, Beorlegui NT; 2007.  $\alpha$ -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology*, 68: 958-965.
- Schini SA and Bavister BD; 1988. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod.* 39:1183– 1192.
- Scott L, Whittingham DG; 2002. Role of facilitative glucose uptake in the glucose-inorganic phosphate-mediated retardation and inhibition of development in different strains of mouse embryos. *Reproduction.* 123:691–700.
- Seshagiri PB and Bavister BD; 1989. Glucose inhibits development of hamster 8cell embryos in vitro. *Biol Reprod.* 40:599–606.
- Shi DS, Lu KH, Gordon I; 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. *Theriogenology.* 33:324.

- Sirard MA, Florman H, Leibfried-Rutledge ML, First NL; 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod*; 40, 1527–1563.
- Smith C and Ruane J; 1987. Use of sib testing as a supplement to progeny testing to improve the genetic merit of commercial semen in dairy cattle. *Can. J. anim. Sci.* 67:985-990.
- Smith C; 1988. Applications of Embryo Transfer in Animal Breeding. *Theriogenology*. 29:203-212.
- Stabenfeldt GH, Edqvist LE; 2002. Attività riproduttiva della femmina. *Fisiologia degli animalidomestici*. Ed. italiana a cura di Bacci M.L., Baratta M., Barboni B., Bono G., Caola G., Fazio E., Ferlazzo A., Forni M., Gaiani R., Galeatti G., Grasselli F., Mattioli M., Panzera M., Parmeggiani A., Piccione G., Simontacchi C., Spinaci M., Tamanini C., Ed. IdelsonGnocchi 36: 736-769.
- Stojkovic M, Kolle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson J G, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Sinowatz F and Wolf E; 2002. Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen–thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction*. 124, 141–153.
- Stroud B; 2011 IETS Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *IETS Newsletter*.
- Teepker G and Keller DS; 1989. Selection of sires originating from a nucleus breeding unit for use in a commercial dairy population. *Can. J. anim. Sci.* 69:595-604.
- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE; 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*. 30 (3): 493-497.
- Tesarik J; 1993. *Metabolism of human preimplantation embryos. Preconception and preimplantation diagnosis oh human genetic diseases*, ed R.G. Edward. Cambridge University Press. 43-79.
- Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Tervit HR; 1992. Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 31:253–257.
- Totey SM, Pawshe CH, Singh GP; 1993. In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes (*Bubalus Bubalis*): Effects of media, hormones and sera. *Theriogenology*. 39, 1153-1171.
- Totey SM, Singh G, Taneja M, Pawshe CH, Talwar GP; 1992. In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus Bubalis*). *J. Reprod. Fertil*. 95, 597-607.

- Turner K, Goldstei D and Rogers A; 1992. Variaton in the dry mass of mouse embryos throughout the preimplantation period. *Hum Reprod.* 112-116.
- Uysal O, Bucak MN, Yavas I, Varish O; 2007. Effect of various antioxidants on the quality of frozen- thawed bull semen *J. Anim. Vet. Adv.* 6:12 1362-1366.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS; 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 121:1129.
- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P; 2002. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology.* 57(8):2105-2117.
- Wei H and Fukui Y; 2000. Fertilisability of ovine, bovine or minke whale (*Balaenotera acutorostrata*) spermatozoa intracytoplasmic injected into bovine oocyte. *Zygote* 8. 267-274.
- Whitten WK and Biggers JD; 1968. Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.* 17, 399-401.
- Whittingham DG; 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 14, 7-21.
- Wurth YA, Boni R, Hulshof SCJ, Kruip ThAM; 1994. Bovine embryo production in vitro after selection of ovaries, follicles and oocytes. In: Wurth YA, *Bovine Embryo Production In Vitro. Influencing Factors.* Utrecht, The Netherlands: Utrecht University Press. 67-85.
- Wurth YA, Kruip ThAM; 1992. Bovine embryo production in vitro after selection of the follicles and oocytes. In: *Proceedings of the 12th International Congress of Animal Reproduction (ICAR); August 23-27, 1992; The Hague, The Netherlands.* 1:387-389.
- Yamauchi, N., H. Sasada, E. Soloy, T. Dominko, K. Kikuchi, and T. Nagai ; 1999. Effects of hormones and osmolarity in the culture medium on germinal vesicle breakdown of porcine oocytes. *Theriogenology.* 52:153-162.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, 1994. p. 189-318.
- Yanagimachi R; 2005. Male Gamete Contributions to the Embryo. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1061: 203-207.

- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Haard MGM, Rodriguez Martinez, H; 1999. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AIprogram. *Int. J. Androl.* 22, 253–260.
- Zicarelli L; 2002. Advanced reproductive technologies for improving buffalo production. 1st 440 Buffalo Symposium of Americas, Estacao das Docas, Belèm, Pará, Brazil. 186 – 197.
- Zicarelli, L 1997. Reproductive seasonality in buffalo. *Proceedings of the Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes (Issue II)*, Caserta, Italy, 29–52.



## **Capitolo 2**

### La Crioconservazione



## 2.1 La Crioconservazione

I primi esperimenti di crioconservazione risalgono al 1776 quando fu osservato che era possibile conservare la motilità spermatica esponendo spermatozoi umani a basse temperature (Van der Elst et al., 1997). Nel 1949 furono utilizzati i primi crioprotettori, come il glicerolo, per crioconservare seme di pollo (Polge et al., 1949). Nel 1953, si ottenne uno sviluppo embrionale a termine dopo la fecondazione di oociti utilizzando seme umano congelato, su ghiaccio secco, e scongelato (Sherman e Bunge, 1953). Nel 1964, Perloff et al. riportarono la prima gravidanza ottenuta utilizzando seme umano congelato con glicerolo e vapori di azoto liquido. Da allora molti studi sono stati svolti al fine di sviluppare nuovi metodi per preservare il materiale biologico dai danni del congelamento.

La crioconservazione permette di bloccare i processi metabolici della cellula che viene congelata e stoccata a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  in azoto liquido (LN<sub>2</sub>), una temperatura considerata ideale per lo stoccaggio di materiale biologico. È noto che a temperature più alte ( $-136^{\circ}\text{C}$ ) la vitalità cellulare decresce durante la conservazione a lungo termine. Queste temperature, infatti, sono idonee per lo stoccaggio di sospensioni microbiche o di colture di tessuti di mammifero, in cui una riduzione della vitalità

può essere accettabile dato l'elevato numero di cellule utilizzate, mentre risultano inadeguate per la crioconservazione di embrioni, oociti e spermatozoi. Solitamente il congelamento delle singole cellule è più semplice da un punto di vista criobiologico; gli spermatozoi, gli oociti rappresentano però un'eccezione poiché sono molto sensibili allo stress da freddo, a causa della loro struttura altamente specializzata. Gli embrioni e i gameti hanno comunque la capacità di autoripararsi completamente o anche solo parzialmente dai danni subiti, in modo da non bloccare lo sviluppo. Mediante le tecniche di crioconservazione è possibile interferire con la normale fisiologia cellulare e bloccare il tempo biologico, con la possibilità di poter conservare per tempi illimitati sia cellule germinali che embrioni. Tuttavia la procedura di crioconservazione determina una serie di danni che variano in base all'intervallo di temperature che le cellule attraversano:

- A temperature comprese tra  $+15$  e  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , il danno maggiore si ha a carico delle gocce lipidiche citoplasmatiche e dei microtubuli (Aman e Parks, 1994; Leibo et al., 1996; Zenzes et al., 2001). Il danno ai microtubuli è reversibile, mentre quello alle gocce lipidiche è di natura irreversibile;

infatti, si ha una maggiore incidenza di morte cellulare negli oociti e negli embrioni che contengono molti lipidi.

- A temperature comprese tra  $-5$  e  $-80$  °C, il maggiore danno che si può avere è la formazione dei cristalli di ghiaccio sia a livello extracellulare ma ancor di più a livello intracellulare.

- A temperature comprese tra  $-50$  e  $-150$  °C i danni che si possono avere maggiormente sono quelli meccanici, ad esempio, la rottura della zona pellucida o del citoplasma.

La fase meno pericolosa di tutta la procedura di crioconservazione è lo stoccaggio al di sotto dei  $-150$  °C; in questo caso il danno che si verifica più frequentemente è imputabile ad uno scongelamento accidentale in cui l'impossibilità di controllare la discesa termina può indurre danni al DNA (Rall, 2001).

La crioconservazione è considerata uno strumento ottimale per accelerare la diffusione in campo delle biotecnologie riproduttive. Ad esempio, la crioconservazione del seme ha dato un impulso notevole alla diffusione dell'IS, che oggi viene utilizzata in modo routinario nella maggior parte delle aziende. È stato dimostrato che spermatozoi bovini crioconservati per più di 50 anni non hanno mostrato una significativa riduzione della vitalità, né alterazioni di tipo mutagenico (Elder e Brian, 2000). Per quanto riguarda la crioconservazione degli oociti, nonostante numerosi studi siano stati effettuati a partire dalla metà del secolo scorso, tuttora non si è riusciti a trovare una tecnica adeguata alla loro crioconservazione. Il vantaggio di ottimizzare le tecniche di crioconservazione degli oociti potrebbe essere quello di avere a disposizione una maggiore quantità di materiale germinale da utilizzare per l'IVEP e/o altre micromanipolazioni cellulari, dalle semplici prove di penetrazione spermatica alle tecniche più complicate di ingegneria genetica e clonazione. Inoltre, mettere a punto un metodo efficace di crioconservazione degli oociti sarebbe fondamentale se si considera la ristretta fase fertile degli oociti di mammifero. In campo umano, ad esempio, il perfezionamento della tecnica di crioconservazione potrebbe permettere a molte donne, che per svariati motivi hanno perso la funzionalità delle gonadi, di ristabilire l'attività riproduttiva, evitando i problemi etici e, in alcuni Paesi i vincoli legislativi, legati alla crioconservazione embrionale. La possibilità di crioconservare gli embrioni ha, d'altro canto, contribuito alla diffusione della tecnologia dell'ET, sia nella specie bovina che in altre specie domestiche. La conservazione degli embrioni per tempi illimitati permette di superare le problematiche che ostacolano l'applicazione commerciale delle procedure di ET, ad esempio la necessità di pianificare

gli interventi di trasferimento embrionale, in modo da ridurre i costi, e la scarsa disponibilità di animali riceventi.

## 2.2 Fisica della crioconservazione

Il processo di crioconservazione è in grado di rallentare o arrestare alcune reazioni biochimiche, ma anche di accelerarne delle altre. Quando i gameti e gli embrioni di mammifero vengono sottoposti a temperature che vanno al di sotto dello zero e, quindi, vengono sottoposti ad una condizione non-fisiologica, il meccanismo di difesa che riescono a mettere in atto è inappropriato ed insufficiente. Inoltre, l'acqua che si solidifica dopo il congelamento risulta letale nonostante sia un elemento essenziale allo stato liquido, sia per la struttura che per la funzione delle cellule viventi. Durante i processi di congelamento il pericolo maggiore per le cellule non è rappresentato dallo stoccaggio a temperature molto basse, ma dal passaggio della zona intermedia di temperatura critica (tra  $+15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) che si ha sia durante la fase di raffreddamento, che durante quella di riscaldamento (Dobrinisky, 1996; Martino et al., 1996a; Isachenko et al., 1998; Zeron et al., 1999). Una volta arrivati a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  le reazioni chimiche non possono avere luogo, poiché non c'è energia termica a sufficienza. Questo accade perché l'acqua, al di sotto di  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ , non esiste allo stato liquido, ma solo allo stato cristallino o vitreo, dove la viscosità è talmente alta da limitare fortemente la diffusione delle molecole. Ci sono alcuni concetti fondamentali che vanno presi in considerazione, vista l'importante funzione dell'acqua e dei cambiamenti di stato che essa subisce durante tutto il processo di crioconservazione, che sono responsabili dei danni letali che si verificano nelle cellule. Partiamo dal superaffreddamento e cioè la capacità di una soluzione acquosa di raffreddarsi al di sotto del proprio punto di congelamento senza cambiare stato, cioè senza passare dallo stato liquido a quello solido. In questo caso, se si tocca la soluzione acquosa o l'acqua con un cristallo o con un oggetto metallico parte il processo di cristallizzazione e la temperatura ritorna immediatamente al punto di congelamento. Questo processo viene chiamato "seeding", e viene di solito usato per avere un congelamento controllato manualmente. Il seeding può essere indotto dalle particelle presenti nel medium o dalla vibrazione meccanica di superfici. Questo è un fenomeno che si verifica nell'atmosfera. L'acqua e le soluzioni acquose tendono a raffreddarsi al di sotto del punto di fusione prima che inizi la formazione del ghiaccio. Ciò è facilmente comprensibile se si tiene conto del fatto che, anche se il punto di fusione del ghiaccio è  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la sua formazione può avvenire a temperatura al di sotto dello zero e l'acqua può essere raffreddata fino a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  prima che si formi il nucleo di ghiaccio ma ciò può avvenire solo in condizioni molto controllate. Dopo l'attivazione del

processo di formazione del ghiaccio, la temperatura risale nuovamente fino al punto di fusione, per rimanere relativamente costante durante il successivo cambiamento di fase in ghiaccio (plateau di calore latente), e poi scendere rapidamente alla temperatura dell'ambiente. La tendenza di un sistema a superaffreddarsi può essere influenzata da vari fattori, come la temperatura, la purezza delle particelle, il volume, la velocità di congelamento. Il fenomeno del superaffreddamento, nei processi di crioconservazione delle cellule e dei tessuti riproduttivi, si verifica molto spesso. Si potrebbero evitare gli effetti dannosi del superaffreddamento effettuando il seeding quando si congelano le cellule, in particolare, gli embrioni. Infatti, Mazur nel 1984 dimostrò in diversi esperimenti che la formazione controllata del ghiaccio è un fattore fondamentale per la vitalità degli embrioni dopo congelamento/scongelamento, poiché campioni che venivano enucleati ad una temperatura inferiore a  $-9^{\circ}\text{C}$  erano meno vitali di quelli in cui l'enucleazione veniva effettuata a temperature di  $-5$  e  $-7^{\circ}\text{C}$ . Per questo motivo, durante il congelamento lento, le paillette di solito sono raffreddate fino alla temperatura di  $-7^{\circ}\text{C}$ , temperatura che viene mantenuta fino al raggiungimento dell'equilibrio termico, e dopo, toccando esternamente la paillette con delle pinze raffreddate in azoto liquido, si induce la formazione del ghiaccio. A questo punto la temperatura della paillette aumenta fino al punto di fusione della soluzione e, dopo la formazione di ghiaccio, ritorna, ad una velocità di  $2.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  a  $-7^{\circ}\text{C}$ . Questo processo consente di ottenere la disidratazione cellulare, importante per ridurre al minimo i danni da freddo che dipendono dalla formazione dei cristalli di ghiaccio. Quindi il processo del superaffreddamento fa in modo che, fino alla temperatura di  $-5^{\circ}\text{C}$ , sia le cellule che il medium che le circonda non congelano, questo grazie alla presenza di crioprotettori all'interno dei terreni che abbassano il punto di fusione. Infatti, solo al di sotto dei  $-5^{\circ}\text{C}$  inizia la formazione del ghiaccio nel medium extracellulare, mentre le cellule rimangono superaffreddate, probabilmente per effetto della membrana plasmatica che blocca la crescita dei cristalli di ghiaccio nel citoplasma. Durante le procedure di congelamento, per far sì che la dinamica del congelamento segua questo percorso, le cellule sono esposte a soluzioni ipertoniche crescenti, per favorire la disidratazione della cellula e, quindi, far uscire l'acqua dall'interno all'esterno della cellula ed evitare la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare, che può verificarsi sia prima sia, in parte, dopo l'inizio dell'enucleazione del ghiaccio. Inoltre, è fondamentale avere una giusta velocità di raffreddamento per ottenere una buona disidratazione cellulare; ciò consente alla cellula di stabilire un

equilibrio con la soluzione esterna. In questo modo la soluzione esterna congela prima del medium all'interno della cellula grazie all'effetto protettivo delle membrane. Una buona disidratazione si ottiene anche grazie all'ambiente ipertonico che si viene a creare all'esterno della cellula, consentendo un flusso d'acqua dall'interno verso l'esterno della cellula. Invece, una velocità di raffreddamento molto bassa causerebbe una eccessiva disidratazione cellulare e una concentrazione intracellulare dei soluti molto alta disturbando l'equilibrio. In questi casi la morte cellulare può essere causata dai lunghi periodi di esposizione alle condizioni ipertoniche e dalla tossicità dei crioprotettori (CP). Invece, con una velocità di congelamento troppo alta non ci sarebbe tempo sufficiente ad ottenere una disidratazione adeguata, e si formerebbero cristalli di ghiaccio con esiti letali per le strutture. Pertanto, nei processi di crioconservazione, la velocità di congelamento ottimale deve essere la più alta possibile alla quale non si verifichi la formazione di ghiaccio intracellulare. Una velocità di congelamento ottimale è stata riconosciuta per diversi tipi cellulari, ma non è ancora stata ancora trovata per le cellule riproduttive. Durante la fase di scongelamento le cellule congelate attraversano le stesse fasi prima descritte, ma nell'ordine invertito. Il campione congelato comincia a fondere, i CP e l'acqua, per le caratteristiche ipertoniche del mezzo in cui si trovano, si spostano nella parte extracellulare attraverso le membrane cellulari e proprio in questa fase, prima che si compia la completa fusione del campione, è possibile la formazione dei cristalli di ghiaccio intracellulare. È stato visto che rapide velocità di scongelamento risultano migliori di quelle lente, poiché limitano i danni che si possono verificare nel passaggio dallo stato solido a quello liquido. Quindi, le procedure di scongelamento convenzionali consistono nel mettere a contatto la paillette con l'aria per 40 secondi, in modo da far risalire la temperatura fino a  $-50^{\circ}\text{C}$ , e poi il trasferimento in acqua calda a  $30^{\circ}\text{C}$  per 1 minuto circa.



### 2.3 I Media di Congelamento

I crioprotettori sono sostanze che hanno la capacità di proteggere le cellule e ridurre al minimo i danni provocati dalle fasi di congelamento e scongelamento. Vengono aggiunti ai terreni di congelamento per migliorare la sopravvivenza cellulare.

I crioprotettori (CP) possono essere di tre tipi (Cean et al., 2011):

1. CP permeabili a basso peso molecolare (metanolo, glicole etilenico (EG), 1,2-propandiolo, dimetilsulfossido (DMSO), 2,3-butandiolo, glicerolo e altri alcoli);
2. CP non permeabili a basso peso molecolare (galattosio, glucosio, saccarosio, trealosio e altri zuccheri);
3. CP non permeabili ad alto peso molecolare, > di 50.000 Da (polivinilpirrolidone, polivinil alcool, amido idrossietilico, ialuronato di sodio e altri polimeri).

I CP permeabili a basso peso molecolare sono piccole molecole che permeano facilmente le membrane cellulari, formano legami idrogeno con molecole d'acqua e prevengono la formazione di cristalli di ghiaccio. Essi giocano un ruolo importante nella crioconservazione perché proteggono la cellula dagli effetti della soluzione rimpiazzando per osmolarità l'acqua all'interno delle cellule, prima del congelamento. Inoltre i CP permeabili combinati con una velocità di congelamento

bassa e controllata, sono in grado di diminuire i cambiamenti del volume cellulare e ridurre al minimo la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno della cellula.

I CP non permeabili a basso peso molecolare, invece, hanno la capacità di provocare una disidratazione delle cellule prima del congelamento, che comporta una diminuzione della formazione dei cristalli di ghiaccio. È necessario però che questi CP vengano combinati con i crioprotettori permeabili per svolgere la loro funzione durante il congelamento. I CP non permeabili giocano un ruolo importante anche durante la fase di scongelamento. Infatti, la pressione osmotica extracellulare diminuisce rapidamente durante lo scongelamento e può verificarsi uno shock osmotico se non si utilizza un adeguato crioprotettore. I CP ad alto peso molecolare, proteggono le cellule durante il congelamento/scongelamento modificando la forma e la grandezza dei cristalli di ghiaccio in modo da non renderli dannosi, stabilizzando le strutture intracellulari e le membrane. I CP permeabili a basso peso molecolare più comunemente usati sono il glicerolo, il DMSO e l'EG (Brake e Niemann, 1995). I diversi CP e le loro diverse

proprietà suggeriscono che ciascuno protegge le cellule contro i danni da congelamento in maniera specifica, quindi una combinazione adeguata di crioprotettori potrebbe fornire una protezione più efficace.

## 2.4 Principali tecniche di crioconservazione

Diversi sono i metodi oggi utilizzati per la crioconservazione; fin dagli anni '60, quando si iniziarono a riscontrare i primi successi nel campo della crioconservazione di embrioni, furono considerati due gruppi di metodi, il congelamento lento, in presenza di equilibrio, ed il congelamento rapido e la vitrificazione, quest'ultimi in assenza di equilibrio. La differenza principale tra questi due gruppi è l'utilizzo dei CP e la fase di raffreddamento, la fase di scongelamento e la reidratazione, cioè la rimozione dei CP (Cean et al. 2011).

### 2.4.1 Il congelamento lento

Il congelamento lento è la tecnica con cui la maggior parte degli embrioni di mammifero, compreso l'uomo, sono stati congelati. Questa metodica viene eseguita con tecniche convenzionali di equilibrio, usando CP permeabili a lenta diffusione (EG, glicerolo, DMSO e PG), raffreddamento lento controllato con una velocità di  $0.3/1^{\circ}\text{C}$  al minuto e velocità di riscaldamento relativamente rapide ( $250^{\circ}\text{C}$  al minuto). In questa procedura i danni tossici ed osmotici, causati dalla concentrazione relativamente bassa delle soluzioni dei crioprotettori, sono limitati, ma si assiste alla formazione dei cristalli di ghiaccio; quindi sono necessari ulteriori accorgimenti per minimizzare i danni. La bassa velocità di questa procedura permette gli scambi tra i fluidi extra ed intracellulari senza gravi effetti osmotici e, quindi, senza deformazione del volume delle cellule; è, d'altra parte, proprio da questa caratteristica che deriva l'altro nome della metodica: congelamento con equilibrio. Ai fini della sopravvivenza post-scongelamento, fondamentale risulta la corretta esecuzione di ogni passaggio che mira a ridurre al minimo i danni ed a preservare le funzioni cellulari durante la procedura. Per limitare i danni, soprattutto determinati da velocità di congelamento inadeguate, con il congelamento lento è necessario l'impiego di macchine programmate che consentano una graduale discesa della temperatura. Questa esigenza incide chiaramente sui costi e anche sul tempo necessario richiesto per l'intera procedura di crioconservazione.

### 2.4.2 Il congelamento rapido

Quando si mettono in atto quelle procedure di crioconservazione in cui le velocità di congelamento utilizzate sono molto alte, e le cellule e i tessuti non sono in equilibrio con le alte concentrazioni di CP permeabili e non permeabili, si parla di congelamento rapido o congelamento in assenza di equilibrio. Durante questa procedura l'utilizzo delle alte concentrazioni di CP causa una disidratazione cellulare repentina e la fase di equilibrio risulta assente perché il congelamento avviene prima. Con questa tecnica, le cellule parzialmente disidratate sono congelate utilizzando alte velocità di congelamento di circa 1250 °C/minuto. La caratteristica principale che si evidenzia nella crioconservazione con il congelamento rapido è l'utilizzo di una miscela di CP composta da una soluzione 2-4.5 M di un CP permeabile e 0.25-0.5 M di un CP non permeabile (Rayos et al., 1992; Takashi et al., 1992; Shaw et al., 1991). Questa procedura risulta naturalmente molto più rapida di quella precedentemente descritta; infatti, le cellule vengono esposte brevemente (al massimo 3 minuti) alla soluzione di congelamento contenente la miscela di CP e, senza che raggiungano l'equilibrio, solo in un parziale stato di disidratazione, vengono congelate in LN2 dopo essere state esposte a temperature intermedie sui vapori di LN2 (di solito per circa 1 minuto). In questo caso l'acqua extracellulare congela e l'osmolarità della soluzione di congelamento incrementa, provocando un'ulteriore perdita di acqua congelabile dalle cellule. In queste condizioni, però, è possibile la formazione di ghiaccio intracellulare con conseguenti danni qualora le velocità di riscaldamento durante lo scongelamento non siano idonee.

### 2.4.3 La vitrificazione

Negli ultimi anni per rendere più semplice e più economica la metodica di crioconservazione è stata introdotta una nuova tecnica, la vitrificazione. Questa metodica ha numerosi vantaggi e ha dato degli ottimi risultati, consentendone un'ampia diffusione. Con il termine vitrificazione si intende un congelamento ultrarapido di una soluzione acquosa che provoca un aumento della viscosità della soluzione ed il conseguente passaggio di fase da uno stato liquido ad uno stato vetroso senza la formazione di cristalli di ghiaccio mantenendo le proprietà di un liquido in forma solidificata (Rall e Fahy, 1985). Questo fenomeno richiede velocità di raffreddamento alte o l'utilizzo di soluzioni di crioprotettori che deprimono la formazione di ghiaccio ed incrementano la viscosità a basse temperature. Per vitrificare il

campione, che viene immerso direttamente in azoto liquido, con una temperatura di raffreddamento di circa 2500 °C/minuto, sono necessarie concentrazioni molto alte (da 5 a 7 M) di CP che, però, possono risultare molto tossiche per le cellule. In teoria, i CP potrebbero anche essere utilizzati a concentrazioni più basse, tipo 1.5 M, ma in questo caso sarà necessario utilizzare una velocità di congelamento molto più alta, circa 15000°C/min, e questo potrebbe essere realizzato solo usando attrezzature sofisticate e costose. Le elevate concentrazioni di crioprotettori nell'ambiente extracellulare, rendono più viscosa la soluzione e facilitano una disidratazione dell'embrione, con una parziale diffusione di crioprotettori a livello intracellulare. Se a questo fenomeno si associa anche un rapido abbassamento della temperatura, si bypassa la formazione di cristalli di ghiaccio. Proprio la necessità di minimizzare questi danni, ha indotto molti ricercatori, all'inizio della diffusione della tecnica della vitrificazione, a concentrare i propri studi nel tentativo di trovare crioprotettori meno tossici e più permeabili. Come risultato, l'EG è diventato un componente standard presente quasi in tutti i protocolli di vitrificazione perché considerato il CP con la minore tossicità e la maggiore permeabilità, anche se risulta comunque tossico alla concentrazione necessaria per ottenere la vitrificazione (8 M). Recentemente, così come il GE, il saccarosio è diventato quasi un componente standard nelle soluzioni di vitrificazione. La tossicità di quest'ultimo, così come degli altri zuccheri, può essere ridotta se usato a basse temperature (Rall, 1987). Infatti, il saccarosio non sembra avere effetto tossico a basse temperature ed influisce positivamente sulla sopravvivenza embrionale quando applicato per bilanciare il rigonfiamento dopo riscaldamento (Kasai et al., 1996; Vajta et al., 1997a). Studi recenti hanno dimostrato che, per ottimizzare l'efficienza della vitrificazione, si deve, da una parte identificare un sistema sicuro per arrivare a velocità massime e realizzabili di raffreddamento e riscaldamento e, dall'altra, minimizzare gli effetti tossici ed osmotici dell'alta concentrazione di CP. La maggior parte dei metodi di vitrificazione, inizialmente, utilizzava le tradizionali paillette da inseminazione per caricare embrioni o oociti. Queste, però, presentano dei limiti, quali l'impossibilità di usare velocità di raffreddamento/riscaldamento superiori a 2000 °C/min e la necessità di usare un volume cospicuo di soluzione vitrificante per caricare il campione. Fin dai primi esperimenti di vitrificazione era facilmente intuibile che il metodo più semplice per aumentare la velocità di raffreddamento era sicuramente quello di ridurre il volume della soluzione da vitrificare e cercare di stabilire un contatto diretto

tra questa e l'LN2. Una metodica messa appunto nell'ultimo decennio e che utilizza il minimo volume possibile di soluzione di vitrificazione è il Cryotop, costituito da una sottile linguetta di polipropilene legata ad un manico di plastica, fornito di un cappuccio protettivo per la conservazione del campione vitrificato in LN2 (Kuwayama and Kato, 2000; Kuwayama et al., 2005a). È un metodo molto vantaggioso poiché è semplice da eseguire e soprattutto permette di raggiungere velocità di raffreddamento e riscaldamento molto alte evitando la rottura della zona pellucida.

## 2.5 Crioconservazione degli embrioni

La prima gravidanza da embrioni bovini congelati/scongelati è stata ottenuta nel 1973 (Wilmot e Rowson, 1973). Questi studi hanno evidenziato che il congelamento di embrioni bovini a temperature al di sotto dello zero ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) richiedeva uno scongelamento lento. Willadsen nel 1977 dimostrarono che il congelamento lento degli embrioni poteva essere interrotto a temperature sotto zero relativamente alte (tra  $-25$  e  $-35^{\circ}\text{C}$ ) per poi immergere il campione direttamente in LN<sub>2</sub>, ma in questo caso era necessario uno scongelamento rapido. Nel 1985 Rall e Fahy attuarono i primi esperimenti con la tecnica della vitrificazione, applicandola per la prima volta ad embrioni di topo; mentre la prima gravidanza, ottenuta dal trasferimento di embrioni bovini vitrificati, è stata descritta da Massip et al. nel 1995. Negli ultimi anni, i miglioramenti nel campo della crioconservazione embrionale hanno permesso di crioconservare con successo embrioni della maggior parte delle specie domestiche ed in particolare di bovino (Lazar et al. 2000; Zhang et al., 1993), pecora (Ptak et al., 1999; Dattena et al., 2000), capra (Baril et al., 1989; El Gayar e Holtz 2001; Traldi, 2000), cavallo (Hochi et al., 1994), maiale (Hayashi et al., 1989; Berthelot et al., 2000) e bufalo (Neglia et al. 2001; De Rosa et al., 2005).

Esistono molteplici fattori che influenzano la congelabilità degli embrioni quali la velocità di congelamento/scongelamento e la tossicità dei crioprotettori già ampiamente descritti in precedenza, a cui si aggiungono la specie, lo stadio di sviluppo embrionale, il contenuto lipidico intracellulare e l'origine degli embrioni (prodotti in vivo o in vitro). Nel maiale, ad esempio, la crioconservazione di embrioni con un contenuto lipidico più basso ha permesso di incrementare l'efficienza del congelamento (Nagashima et al. 1994; Dobrinsky et al., 2000). Numerosi studi indicano che gli embrioni di bovino prodotti in vitro sono più sensibili alla crioconservazione di quelli prodotti in vivo proprio a causa del diverso rapporto tra lipidi e proteine (Leibo e Loskutoff, 1993; Martino et al., 1996). Inoltre, il contenuto e la composizione lipidica intracellulare influenzano positivamente anche la congelabilità degli embrioni prodotti in vivo (Abd El Razek et al., 2000). In altri studi è stata paragonata la capacità di sviluppo in vitro di embrioni bovini vitrificati ed embrioni congelati; O'Kearney-Flynn et al. (1998) hanno riportato una percentuale di sviluppo in vitro dell'86 % per embrioni vitrificati/riscaldati e del 58 % per embrioni congelati/scongelati e, dopo il trasferimento, la percentuale di gravidanza di embrioni vitrificati/riscaldati (24 %) e di embrioni congelati/scongelati (28

%) è risultata simile a quella di embrioni trasferiti freschi (26 %). Inoltre, in un altro esperimento è stata riportata una sopravvivenza più bassa per embrioni bovini congelati rispetto agli embrioni vitrificati (Niemann, 1991). Uno studio più approfondito sulla possibilità di vitrificare embrioni bovini a differenti stadi di sviluppo è stato fatto nel 1998 da Vajta et al. In questo studio è emerso che lo sviluppo di embrioni vitrificati al giorno 1 e 2 di coltura, dove il giorno 0 corrispondeva al giorno della fecondazione, è stato significativamente più basso rispetto al gruppo controllo (non vitrificati), mentre la capacità di sviluppo in vitro di embrioni vitrificati dal giorno 3 al giorno 8 di coltura non è risultata statisticamente differente dai rispettivi controlli (Vajta et al. 1998). È evidente che la crioconservazione degli embrioni assume un ruolo centrale nelle tecnologie riproduttive, per lo sviluppo di programmi di riproduzione negli animali (Massip et al., 2004) permettendo inoltre di allestire criobanche di materiale genetico di animali in via d'estinzione.



## 2.6 Crioconservazione degli oociti

La realizzazione di un metodo efficace per la crioconservazione degli oociti di mammiferi porterebbe una grande svolta nel campo della biologia riproduttiva per la conservazione delle risorse genetiche. Tuttavia, nonostante i recenti progressi, l'efficienza della crioconservazione degli oociti è ancora molto bassa a causa dei danni morfologici e funzionali indotti dal congelamento e dalla potenziale tossicità dei crioprotettori (Zeron et al., 1999; Paynter, 2005). Diverse strategie sono state sviluppate per minimizzare questi danni e aumentare la vitalità degli oociti e la competenza allo sviluppo, sebbene con un successo limitato (Vajta e Kuwayama, 2006; Ledda et al., 2007). Attualmente, la crioconservazione dell'oocita viene eseguita sia su oociti immaturi allo stadio di vescicola germinale (GV) sia su oociti maturi allo stadio di metafase II (MII). Lo stadio del ciclo cellulare durante la meiosi sembra influenzare la sopravvivenza degli oociti di mammiferi e la resistenza alla crioconservazione (Practice Committees of American Society for Reproductive et al., 2013). Gli oociti immaturi sono più suscettibili alle lesioni da crioconservazione e la loro capacità di sopravvivenza e di sviluppo è notevolmente ridotta (Diez et al., 2005; Hochi et al., 1996). Un fattore che influisce sul successo della crioconservazione degli oociti immaturi è il danno che si verifica alle cellule del cumulo che circondano gli oociti. Sono state riportate alterazioni ultrastrutturali dei COC e la perdita di cellule del cumulo dopo la crioconservazione (Hochi et al., 1996; Ruppert-Lingham et al., 2006). Dalla letteratura è emerso che le giunzioni gap tra gli oociti e le cellule del cumulo svolgono un ruolo importante nel processo di maturazione (Gilchrist et al., 2004). È stato dimostrato, inoltre, che gli oociti in fase GV, in cui sono state eliminate le cellule del cumulo, mostrano una mancata coordinazione tra maturazione nucleare e citoplasmatica (Goud et al., 1999; Combelles et al., 2002) e ovviamente hanno uno sviluppo minore (Wongsrikeao et al., 2005). L'assenza di cellule del cumulo è anche correlata ad una diminuzione della sintesi proteica, riguardante le molecole coinvolte nella regolazione dei cicli cellulari meiotici e mitotici (Combelles et al., 2005). Gli oociti maturi, invece, hanno una maggiore stabilità della membrana al congelamento, anche se l'esposizione a temperature sub-fisiologiche induce danni al fuso mitotico, con conseguenti aberrazioni cromosomiche che compromettono la fecondazione (Chen et al., 2003; Tharasanit et al., 2006). Inoltre, l'oocita è una cellula molto grande con una bassa permeabilità all'acqua, ciò significa che ha la tendenza a trattenere l'acqua una volta raffreddata portando alla

formazione di ghiaccio intracellulare e di conseguenza danni cellulari (Toner et al., 1990; Ruffing et al., 1993; Arav et al., 1996; Zeron et al., 1999).

Lo sviluppo di protocolli di crioconservazione che consentono la sopravvivenza dell'oozita senza danni alle strutture interne è difficile, ma la crioconservazione di oociti non fecondati ha numerosi vantaggi. Tra questi vale la pena menzionare il salvataggio genetico, la conservazione delle specie in via di estinzione, la conservazione di oociti geneticamente modificati, senza contare che l'aumentata disponibilità di gameti si traduce in una riduzione sensibile dei costi della produzione embrionale in vitro. Numerosi studi hanno ipotizzato che i CP comunemente usati e il tipo di metodica di crioconservazione utilizzata, giocano un ruolo importante nei meccanismi del ciclo cellulare come l'oscillazione del calcio e le vie di segnalazione del calcio (Larman et al., 2006; 2007). Larman et al. (2006) hanno dimostrato che il DMSO e l'EG causano aumenti transitori del calcio intracellulare negli oociti di topo maturi, causando l'esocitosi precoce dei granuli corticali. Gli oociti sono anche più suscettibili agli effetti dannosi delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Alcuni studi sul maiale hanno dimostrato che negli oociti crioconservati aumentano drasticamente i livelli di ROS (Somfai et al., 2007; Gupta et al., 2010), provocando effetti dannosi sui mitocondri, diminuzione di adenosina trifosfato (ATP), alterazione dell'oscillazione di calcio durante la fecondazione, apoptosi e blocco dello sviluppo (Yoneda et al., 2004; Favetta et al., 2007). Di conseguenza, la capacità di sviluppo degli oociti crioconservati può essere compromessa. Poiché la crioconservazione svolge un ruolo importante nelle tecniche di riproduzione assistita, sono necessari ulteriori studi per identificare i tipi di danni da congelamento e, possibilmente, trovare una soluzione per migliorare la procedura di vitrificazione degli oociti.

## 2.7 Crioconservazione degli spermatozoi

Il materiale seminale, immediatamente dopo la raccolta, viene diluito in un opportuno terreno, spesso a base di tuorlo d'uovo o latte, sebbene esistono sul mercato extender di nuova generazione che non contengono componenti di origine animale. Solitamente, gli spermatozoi vengono diluiti ad una temperatura simile alla temperatura corporea (da 30 a 39°C), quindi raffreddati a 5 °C e a quel punto viene aggiunto un CP (ad esempio il glicerolo; Polge et al., 1949). Per la maggior parte delle specie domestiche, il passaggio di temperatura da quella corporea al congelamento rappresenta uno stress maggiore per la membrana plasmatica dello spermatozoo, determinando il riarrangiamento e la destabilizzazione dei componenti della membrana e l'afflusso di calcio (Collin et al., 2000; De Leeuw et al., 1993; Maxwell and Johnson, 1997; Noiles et al., 1995). La membrana plasmatica è il sito primario di lesione di uno spermatozoo crioconservato e il danno principale si verifica durante il congelamento e lo scongelamento (Hammerstedt et al., 1990; Parks e Graham, 1992). Durante il congelamento degli spermatozoi, i cristalli di ghiaccio si formano nel mezzo extracellulare, aumentando l'osmolarità dell'acqua non congelata. Per osmosi, l'acqua intracellulare diffonde fuori dallo spermatozoo, disidratando così la cellula e la membrana plasmatica. Allo scongelamento, il fenomeno si ripete in senso inverso: i cristalli di ghiaccio extracellulare si sciolgono e l'acqua diffonde negli spermatozoi. La deformazione ultrastrutturale della membrana plasmatica si verifica come conseguenza dello stress osmotico e di drastici cambiamenti di volume durante il congelamento e lo scongelamento. L'utilizzo di un CP, come il glicerolo, è essenziale per la sopravvivenza delle cellule durante la crioconservazione. L'efficacia del glicerolo è in parte dovuta ai suoi effetti osmotici che aumentano drammaticamente l'osmolarità del terreno, ritardando la formazione di ghiaccio (Hammerstedt et al., 1990). Gli effetti osmotici del glicerolo sono marcati, ma transitori, e un così rapido cambiamento nel volume cellulare non sembra essere dannoso per la funzione spermatica (Liu e Foote, 1998). Inoltre, il glicerolo agisce direttamente sulla membrana plasmatica dello spermatozoo, riducendo la fase di transizione e aumentando la fluidità della membrana durante il raffreddamento (Noiles et al., 1995). Inoltre, durante la crioconservazione, si ha la formazione dei ROS. I ROS sono coinvolti fisiologicamente nei processi di iperattivazione, capacitazione, reazione acrosomiale e zona-binding (Kodama et al., 1996; de Lamirande et al., 1997). Un eccesso di ROS può indurre uno stress ossidativo tale da arrestare

la motilità, bloccare il metabolismo degli spermatozoi (Tosic, 1947) e danneggiare il DNA (Aitken et al., 1998). Inoltre, i ROS provocano una ridotta penetrazione degli oociti e bloccano la fusione uovo-spermatozoo tramite un meccanismo che coinvolge l'ossidazione dei gruppi solfidrilici (Mammoto et al., 1996; Aitken et al., 1998). Gli spermatozoi e il plasma seminale contengono diversi antiossidanti che forniscono protezione contro gli effetti tossici dei ROS (Alvarez e Storey, 1983; Jeulin et al., 1989). Tuttavia, in seguito al processo di crioconservazione, questo sistema antiossidante non riesce a proteggere gli spermatozoi dal danno ossidativo e dagli effetti tossici dei ROS (Bilodeau et al., 2000; Chatterjee e Gagnon, 2001). Pertanto, al fine di ridurre lo stress ossidativo e migliorare la qualità del materiale seminale post-scongelo, gli extender per la diluizione del seme sono stati integrati con diversi composti antiossidanti (Bucak et al., 2007; 2009; Uysal e Bucak 2007; Longobardi et al., 2017a,b).

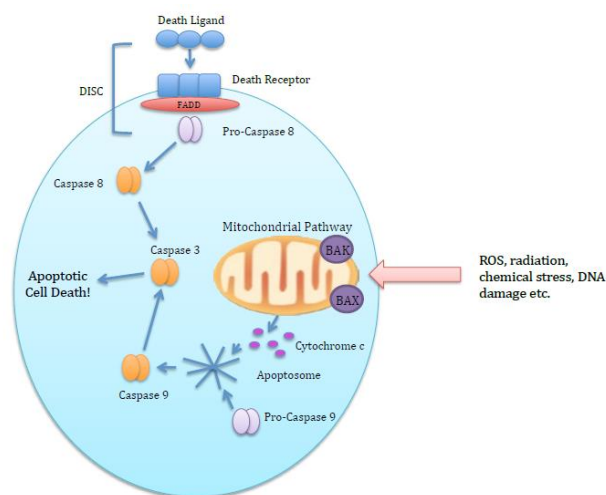
## 2.8 Danni da congelamento e apoptosi

Come ampiamente descritto, la crioconservazione provoca considerevoli lesioni in diversi tipi cellulari, compresi gli oociti bovini, gli embrioni (Men et al., 2003) e gli spermatozoi (Martin et al., 2004). Più specificamente, durante i processi di crioconservazione, diversi meccanismi, tra cui lesioni meccaniche e osmotiche e lo stesso stress ossidativo, alterano le proprietà fisiche delle strutture cellulari inducendo l'attivazione delle vie apoptotiche e di conseguenza la morte cellulare (Baust et al., 2000; Paasch et al., 2004). L'apoptosi è un evento fisiologico ed indica una forma di morte cellulare programmata che interessa le singole cellule senza alcuna infiammazione nel tessuto circostante (Wyllie et al., 1980), a differenza della necrosi che è causata da lesioni, e colpisce un gran numero di cellule, causando gonfiore cellulare e rottura delle membrane. L'apoptosi è un evento osservato in molte specie e in differenti linee cellulari e rappresenta un meccanismo evolutivo conservativo, per regolare la proliferazione delle stesse.

L'apoptosi è un fenomeno complesso che può essere suddiviso in tre fasi: induzione, esecuzione e degradazione. Ci sono due grandi vie di innesco dell'apoptosi, estrinseca, provocata da stimoli esterni alla cellula, ed intrinseca, provocata da stimoli interni (Marti et al., 2008). La via estrinseca è attivata dai recettori del fattore di necrosi tumorale (TNF-R) e da vari ligandi pro-apoptotici, come il TNF, il ligando dell'apoptosi correlato al fattore di necrosi tumorale (TRAIL) e il ligando di morte FAS (FASL), legati ai rispettivi recettori. Questi ligandi sono prodotti da cellule del sistema immunitario, e i recettori si trovano sulla superficie esterna delle membrane cellulari (Aitken et al., 2011). Questi recettori hanno una componente intracellulare composta da un piccolo numero di aminoacidi, chiamato dominio della morte.

La via intrinseca invece, è innescata da fattori come i ROS, la rottura della matrice extracellulare, le radiazioni, il danno al DNA o la mancanza di fattori per la sopravvivenza (Aitken et al., 2011) ed è principalmente regolata dai mitocondri e dalla famiglia delle proteine Bcl-2 (BAX, BAD, BACLxs). Queste ultime regolano la permeabilità della membrana mitocondriale esterna, innescano il rilascio del citocromo-c e altri fattori apoptotici dai mitocondri. I mitocondri hanno un ruolo centrale durante la fase di esecuzione (Green e Reed, 1998), in particolare, dopo l'induzione dell'apoptosi, si verifica l'apertura dei pori mitocondriali nella membrana interna, con conseguente diminuzione del potenziale di membrana mitocondriale, arresto delle fosforilazioni ossidative e rigonfiamento

cellulare. Questa serie di eventi provoca un aumento della permeabilità della membrana esterna e il rilascio del citocromo C nel citosol (Ravagnan et al., 2002). Nel compartimento citoplasmatico, i fattori pro-apoptotici, per esempio, diverse proteasi legate alla famiglia delle caspasi, sono successivamente attivati, portando alla fase di degradazione. Tra i fattori pro-apoptotici ricordiamo il citocromo-c e il fattore pro-apoptotico di attivazione delle proteasi (AApaf1; Ravagnan et al., 2002 ) che insieme all'ATP, formano un complesso (apoptosoma) con la pro-caspasi 9 che porta all'attivazione della caspasi-9 (Reed, 1997; Figura 2.1). Le caspasi, gruppo di proteasi con cisteina nel sito attivo, sono sintetizzate come zimogeni inattivi (pro-caspasi) e vengono attivate dalla scissione durante la cascata di eventi dell'apoptosi (Cohen, 1997). Le caspasi-8 e caspasi-9 sono iniziatori che attivano le caspasi-3. Durante la fase di degradazione, le caspasi-3 e/o Apaf1 possono indurre cambiamenti sia sulla superficie cellulare che nel nucleo (Cohen, 1997; Susin et al., 1999). La fosfatidilserina, che normalmente si trova nella parte interna della membrana plasmatica, appare nel foglietto esterno, dove innesca il riconoscimento fagocitico non infiammatorio della cellula apoptotica (Bratton et al., 1997). Nelle cellule apoptotiche, la scissione internucleosomale del DNA da parte di specifiche endonucleasi produce frammenti di DNA di 180 basi (Kerr et al., 1972).



*Fig. 2.1 Attivazione dell'apoptosi per via intrinseca mediante i ROS, le radiazioni, gli stress chimici e i danni al DNA; Aitken et al., 2011). Lo stress alle cellule causa l'attivazione delle vie intrinseche dell'apoptosi, che provocano il rilascio del citocromo-c da parte dei mitocondri, attivando le caspasi.*

Negli embrioni l'apoptosi regola la proliferazione delle cellule durante lo sviluppo embrionale (Pomar et al 2005), permettendo all'embrione di sopravvivere allo stress mediante la rimozione di cellule danneggiate (Soto et al 2003). Tuttavia, le conseguenze dell'apoptosi sulla competenza allo sviluppo dell'embrione dipendono dalla portata della sua induzione. Infatti, un'alta incidenza di cellule apoptotiche, come osservate negli embrioni prodotti in vitro (Bergeron et al., 1998), è associata ad anomalie morfologiche dell'embrione stesso (Hardy et al., 1989). Inoltre, la crioconservazione porta ad un ulteriore aumento dell'apoptosi (Marquez-Alvarado et al., 2004; Parks et al., 2006; Paschoal et al., 2017) che limita la sopravvivenza degli embrioni (Brison et al., 2000).

Negli oociti la relazione tra crioconservazione e apoptosi è ancora oggetto di discussione. Alcuni studi hanno dimostrato che l'applicazione di diverse concentrazioni di crioprotettori e variazioni di temperature possono portare effetti negativi all'ultrastruttura cellulare (Wu et al., 2006) e incidere sul fenomeno dell'apoptosi (Rajaei et al., 2005). Farzad et al. nel 2013 hanno dimostrato che la crioconservazione degli oociti aumentava l'apoptosi negli oociti in MII di topo. Un aumento dell'attività caspasi è stato riportato in oociti bovini e ovini (Men et al., 2013; Vallorani et al., 2012). Inoltre, l'attività caspasi è risultata negativamente correlata alla sopravvivenza di oociti vitrificati nel suino (Giarretta et al., 2013). Zhao et al., nel 2015 hanno evidenziato un aumentato sviluppo in vitro di oociti bovini vitrificati quando l'attività della caspasi 3 era inibita.

È noto che il normale ciclo di spermatogenesi dipende dall'efficienza dell'apoptosi. Circa il 50% delle cellule germinali degenera e muore nel testicolo dei mammiferi adulti. L'apoptosi spontanea è stata chiaramente osservata nell'epitelio seminifero del testicolo di ratto, che colpisce spermatogoni, spermatociti e spermatidi (Lue et al., 1999). Utilizzando la microscopia elettronica, gli spermatozoi eiaculati hanno mostrato alcune caratteristiche delle cellule somatiche apoptotiche: frammentazione del DNA e condensazione della cromatina, rimozione della membrana acrosomiale e distensione mitocondriale (Baccetti et al., 1996; Blanc-Layrac G. et al., 2000). Inoltre, spermatidi e corpuscoli apoptotici fagocitati da macrofagi possono essere osservati nel seme eiaculato (Baccetti et al., 1996). Nel 1993, Gorczyca et al. osservarono per la prima volta gli spermatozoi con frammentazione del DNA, analoga a quella delle cellule somatiche in apoptosi. La mancata rimozione di queste cellule germinali difettose durante la spermatogenesi comporterebbe un elevato numero di spermatozoi anormali e, di conseguenza, infertilità. Inoltre, la

crioconservazione e/o lo scongelamento del seme di mammifero provocano molti cambiamenti. In particolare si osserva una diminuzione della motilità, cambiamenti della membrana, compresa la capacitazione e la reazione acrosomiale, che influenzano la vitalità del seme (Medeiros et al., 2002). Precedenti studi hanno dimostrato che la crioconservazione nel seme induce alcune delle principali caratteristiche apoptotiche, come la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale, l'attivazione delle caspasi e l'aumento della permeabilità di membrana; questo fenomeno, chiamato 'apoptosis-like change', si pensa che coinvolga alcuni dei meccanismi dell'apoptosi e possa indurre frammentazione del DNA (Martin et al., 2004). Nella maggior parte degli studi, l'apoptosi negli embrioni (Byrne et al., 1999), negli spermatozoi (Muhammad et al., 2002) e negli oociti (Farzad et al., 2013) è stata valutata tramite la colorazione Tunel, che in realtà è una tecnica aspecifica in quanto valuta la frammentazione del DNA, che interviene anche in altri processi di morte cellulare (Grasl-Kraupp et al., 1995). Ne consegue l'importanza di studiare l'inizio cronologico dell'apoptosi in relazione alla qualità degli embrioni, degli oociti e degli spermatozoi come indicatore degli effetti avversi relativi alla coltura in vitro ed alla crioconservazione. La caspasi 3 è una caspasi effettrice, che gioca un ruolo fondamentale nel processo di apoptosi (Zhivotovsky et al., 1997). La pro-caspasi 3 nella forma inattiva è presente nella maggior parte delle cellule, comprese le cellule degli embrioni nella fase del pre-impianto (Warner et al., 1998; Jurisicova et al., 2003) e la sua attivazione in risposta a molti stimoli apoptotici, è cruciale per lo smantellamento dei componenti del citoscheletro, così come per l'attivazione della DNasi. Alcuni studi suggeriscono che l'apoptosi possa essere evitata tramite l'inibizione dell'attività delle caspasi, portando ad un aumento della sopravvivenza delle cellule di mammifero al congelamento (Stroh et al., 2002). Altri studi hanno dimostrato che gli antiossidanti e gli inibitori delle caspasi interferiscono con le vie apoptotiche, inibendo o ritardando il fenomeno "apoptosis-like" nelle cellule somatiche (Hetz et al., 2005; Smolewski e Robak, 2011; Talevi et al., 2013). Ad esempio, un potente inibitore delle caspasi 3 e 7, XIAP (inibitore dell'apoptosi x-linked), blocca l'apoptosi in molti tipi di cellule (Ekert et al., 1999; Saleem et al., 2013; Smolewski e Robak, 2011). E' stato dimostrato che il trattamento con l'inibitore della caspasi carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK) aumenta la vitalità post-scongelamento di embrioni porcini tramite l'inibizione dell'apoptosi indotta dalla crioconservazione (Stroh et



al., 2002; Heng et al., 2007). L'incubazione con l'inibitore della caspasi, prima della vitrificazione, ha aumentato le percentuali di sopravvivenza, cleavage e resa embrionale di oociti porcini prodotti in vitro (Niu et al., 2016). Altri studi hanno investigato gli effetti di alcuni inibitori dell'apoptosi, (XIAP, Coenzima Q10, Bax channel blocker e Z-VAD-FMK) sugli spermatozoi ma non hanno riportato un miglioramento sulla longevità del seme conseguente all'utilizzo di questi inibitori (Peter et al., 2005; Pena et al., 2003). Ciò è attribuibile a diverse cause: alle concentrazioni di inibitori utilizzate che potrebbero essere troppo basse per avere un effetto biologico (Peter et al., 2005), ad un rapporto sproporzionato tra inibitore e spermatozoi impedendo di indurre l'effetto benefico (Pena et al., 2003), all'impossibilità degli inibitori di attraversare la membrana plasmatica dello spermatozoo, poiché il seme è resistente all'assorbimento di molecole esogene (Anzar e Buhr, 2006). In particolare, due diversi studi, hanno riportato un effetto inibente dello Z-VAD-FMK sulle caspasi 1 e 9, che però non si è tradotto con un miglioramento della qualità del materiale seminale (Peter et al., 2005; Peter and Linde-Forsberg, 2003).

## 2.9 Scopo del lavoro

Sulla base di quanto precedentemente descritto, diverse strategie sono state messe a punto al fine di ridurre i danni apoptotici provocati dalla crioconservazione. In particolare, sono stati testati diversi inibitori dell'apoptosi nel tentativo di preservare l'integrità delle membrane senza alterarne il potenziale, ridurre la frammentazione del DNA in seguito all'insulto del congelamento e modulare l'attività delle caspasi bloccando il segnale apoptotico. Allo stato attuale delle nostre conoscenze la strategia di prevenzione dell'apoptosi indotta dal congelamento, mediante inibizione delle caspasi, per migliorare la criotolleranza degli embrioni e dei gameti della specie bovina, non è stata ancora investigata.

Pertanto, lo scopo della tesi è stato quello di indagare se l'aggiunta dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK all'interno dei diversi terreni di congelamento per il seme, di vitrificazione, scongelamento e coltura per gli embrioni e per gli oociti, potesse ridurre l'apoptosi e i danni da congelamento, migliorando la criotolleranza post-scongelamento degli embrioni e dei gameti bovini. La tesi è stata articolata in tre parti. Lo scopo dell'esperimento 1 è stato quello di valutare l'effetto dell'aggiunta dell'inibitore Z-VAD-FMK prima, durante e dopo la vitrificazione sulla criotolleranza degli embrioni bovini prodotti in vitro. A tale fine sono state valutate la sopravvivenza, la progressione allo sviluppo e le percentuali di schiusa delle blastocisti vitrificate dopo 24 e 48 ore di coltura di post-riscaldamento, nonché il numero di cellule embrionali e la loro distribuzione tra trofotoderma e nodo embrionale. Inoltre l'influenza dell'inibitore sull'apoptosi è stata valutata mediante misurazione della frammentazione del DNA e dell'attività della caspasi 3, che è la maggiormente implicata nei danni da freddo. I risultati incoraggianti ottenuti nel corso di questo esperimento ci hanno indotti ad approfondire lo studio estendendo le valutazioni anche ai gameti.

Lo scopo dell'esperimento 2, infatti, è stato quello di studiare gli effetti dell'inibitore Z-VAD-FMK, inserito prima, durante e dopo la vitrificazione sulla criotolleranza degli oociti bovini maturati in vitro. L'efficacia dell'inibitore sulla prevenzione dell'apoptosi è stata valutata mediante stima della frammentazione del DNA, dell'attività caspatica, del potenziale di membrana mitocondriale, nonché della vitalità e della competenza allo sviluppo embrionale dopo fecondazione in vitro.

L'esperimento 3 si è, infine, prefisso l'obiettivo di studiare l'influenza di un trattamento con l'inibitore Z-VAD-FMK prima, durante e dopo il

congelamento sulla criotolleranza degli spermatozoi bovini. L'efficacia del trattamento è stata verificata su diversi parametri indicativi di fertilità spermatica, quali la motilità, la vitalità, l'integrità di membrana, la frammentazione del DNA, l'attività della Caspasi 3 ed il potenziale di membrana mitocondriale.

- Abd El Razek IM, Charpigny G, Kodja S, Marquant-Leguienne B, Mermillod P, Guyader-Joly C et al; 2000. Differences in lipid composition between in vivo and in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*; 53: 346.
- Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB; 2011. Apoptosis in the germ line. *Reproduction*. 141(2):139-50.
- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine D S; 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59:1037-1046.
- Alvarez JG, Storey BT; 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*. 29:548–555.
- Aman RR, Parks JE; 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. *Biol Reprod*, 50:103–110.
- Anzar M and Buhr MM; 2006. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa *Theriogenology* 65: 683-90.
- Arav A, Zeron Y, Leslie SB, Behboodi E, Anderson GB and Crowe JH; 1996. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology*. 33: 589–599.
- Baccetti B, Collodel G, Piomboni P; 1996. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol*. 28: 587–596.
- Baril G, Casamitjana P, Perrin J and Vallet JC; 1989. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthygiene (Berlin)*. 24: 101–115.
- Baust JM, Van Buskirk R, Baust JG; 2000. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *Vitro Cell Dev Biol Anim*. 36(4):262-70.
- Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A et al; 1998. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev*. 12: 1304-14.
- Berthelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C and Terqui M; 2000. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology*. 41: 116-124.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirad MA, Gagnon C; 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 55(3): 282-288.

- Blanc-Layrac G, Bringuier AF, Guillot R, Feldmann G; 2000. Morphological and biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cell Mol Biol. (Noisy-le-grand)*. 46:187–197.
- Bracke C and Niemann H; 1995. New aspect in the freezing of embryos from livestock. In: Proc. 11th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association. Fondation Marcel Mérierux, Lyon France; 101-111.
- Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM; 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*. 272:26159–26165.
- Brison DR; 2000. Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: regulation by survival factors. *Hum Fertil Camb*; 3:36-47.
- Bucak MN, Tuncer PB, Sariozkan S, Basimar N, Taipınar M, Cayan K, Bilgili A, Akalin PP, Buyukleblebici S, Aydos S, Ilgaz S, Sunguroglu A, Oztuna D; 2007. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*. 61:248-253.
- Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ; 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J ReprodFertil*. 117(1): 97-105.
- Cean A, Alexandru T, Bogdan N, Păcală A, Ivan A, Ilie DE; 2011. Mammalian Oocyte Cryopreservation - Review *Animal Science and Biotechnologies*, 2011, 44 (1) 370.
- Chatterjee S, Gagnon C; 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*. 59: 451–458.
- Chen SU, Lien YR, Chao HN, Ho YS, Yang TY, Lee TY; 2003. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing—a review article. *Mol Cell Endocr*. 202:101-107
- Cohen GM; 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 326, 1–16.
- Collin S, Sirard M A, Dufour M and Bailey JL; 2000. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. *J. Androl*. 21: 938–943.
- Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C, Albertini DF; 2002. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in vitro. *Hum Reprod*. 17:1006–16

- Combelles MH, Fissore RA, Albertini DF, Racowsky C; 2005. In vitro maturation of human oocytes and cumulus cells using a coculture threedimensional collagen gel system. *Hum Reprod.* 20:1349–58.
- Dattena M, Ptak G, Loi P and Cappai P; 2000. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. *Theriogenology.* 53: 1511–1519.
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C ; 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod.* 2:48–54.
- de Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B and Verkleij AJ; 1993. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology.* 27: 171–183.
- De Rosa A, Attanasio L, Monaco E, Boccia L, Zicarelli L, Gasparini B; 2005. Vittrificazione di embrioni di bufalo (*Bubalus bubalis*) mediante il metodo delle Open Pulled Straw (OPS): effetto dello stadio di sviluppo. Giornate Scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita, Università degli Studi di Napoli Federico II, Complesso Monte S. Angelo, Napoli, 148.
- Diez C, Duque P, Gomez E, Hidalgo CO, Tamargo C, Rodriguez A, et al; 2005. Bovine oocyte vitrification before and after meiotic arrest: effect on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology.* 64:317–33
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR. and Johnson LA; 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* 62: 564-570.
- Dobrinsky JR; 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology.* 45: 17-26.
- Ekert PG, Silke J, Vaux DL; 1999. Caspase Inhibitor. *Cell Death Differ.* 6:101-6.
- El Gayar M and Holtz W; 2001. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *J. Anim. Sci.* 79: 2436-2438.
- Elder K and Brian D; 2000. Cryopreservation In: *In vitro fertilization.* 2nd edition. Cambridge University Press. 192-228.
- Farzad R, Neda A, Mojdeh S, and Hassan J; 2013. The Effect of Vitrification on Mouse Oocyte Apoptosis by Cryotop Method *Iran Biomed J.* 17(4): 200–205.
- Farzad R, Neda A, Mojdeh S, and Hassan J; 2013. The Effect of Vitrification on Mouse Oocyte Apoptosis by Cryotop Method *Iran Biomed J.* 17(4): 200–205.
- Favetta LA, St John EJ, King WA, Betts DH; 2007. High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. *Free Radic Biol Med.* 42:1201–10.

- Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT; 2004. Oocyte–somatic cell interaction during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci.* 82: 431–446.
- Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z; 1993. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res.* 207:202–205.
- Goud A, Goud P, Qian C, Van der Elst J, Maele GV, Dhont M; 1999. Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured MII oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization and early cleavage divisions. *Fertil Steril.* 72:142–146.
- Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R; 1995. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology.* 21(5):1465-1468.
- Green DR and Reed JC; 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281,1309–1312.
- Gupta MK, Sang JU and Hoon TL; 2010. Effect of vitrification and betamercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility.* 93, 8.
- Hammerstedt RH, Graham JK and Nolan P; 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73–88.
- Hardy K, Handyside AH, Winston RM; 1989. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development.* 107(3):597-604.
- Hayashi S, Kobayashi K, Mizuno J, Saitoh K. and Hirano S; 1989. Birth of piglets from frozen embryos. *Vet. Rec.* 125: 43-44.
- Heng BC, Clement MV, Cao T; 2007. Caspase inhibitor Z-VAD-FMK enhances the freeze thaw survival rate of human embryonic stem cells. *Biosci Rep.* 27(4e5):257-264.
- Hetz C, Vitte P, Bombrun A , Rostovtseva T, Montessuit S et al; 2005 Bax Channel Inhibitors Prevent Mitochondrion-mediated Apoptosis and Protect Neurons in a Model of Global Brain Ischemia\* *journal of Chem and Biol.* 287: 44-108.
- Hochi S, Fujimoto T, Choi YH, Braun J and Oguri N; 1994. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology.* 42: 483-488.

- Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T, Hondo E, Yamada J, Oguri N; 1996. In vitro maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. *Cryobiology*. 33:300–1.
- Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Perez-Sanchez F, Grishchenko V; 1998. Links Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology May*. 36(3): 250-253.
- Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martim D, Calvayrac R; 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research*. 24: 185–196.
- Juriscova A, Latham KE, Casper RF, Varmuza SL; 1998. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *MolReprod Dev*. 51:243-253.
- Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Sakurai T. and Edashige K; 1996. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology*. 33: 459–464.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR; 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26:239–257.
- Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C; 1996. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J. Androl*. 17:151–157.
- Kuwayama M and Kato O; 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 17, 477.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP; 2005a. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online Sep*. 11(3):300-30.
- Larman MG, Katz-Jaffe MG, Sheehan CB, Gardner DK; 2007. 1,2propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte physiology. *Human Reproduction*. 22, 250–259.
- Larman MG, Sheehan BC and Gardner DK; 2006 Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction*. 131 53–61.
- Lazar L, Spak J and David V; 2000. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*. 54: 571-578.
- Ledda S, Bogliolo L, Succu S, Ariu F, Bebbere D, Leoni GG, et al; 2007. Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival. *Reprod Fertil Dev*. 19:13–22.



- Leibo SP, Loskutoff NM; 1993. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 39:81–94.
- Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard JW; 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Science*. 42: 45-53.
- Liu Z and Foote RH; 1998. Osmotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and non-permeable agents. *Cryobiology*. 37: 207–218.
- Longobardi V, Salzano A, Campanile G, Marrone R, Palumbo F, Vitiello M, Zullo G, Gasparrini B; 2017a. Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Theriogenology*. 88:236-243.
- Longobardi V, Zullo G, Salzano A, De Canditiis C, Cammarano A, De Luise L, Puzio MV, Neglia G, Campanile, Gasparrini B; 2017b. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology*. 88:1-8.
- Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A, Wang C; 1999. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*. 140:1709–1717.
- Mammoto A, Masumoto N, Tahara M, Ikebuchi Y, Ohmichi M, Tasaka K, Miyake A; 1996. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. *Biol Reprod*. 55:1063–1068.
- Marquez-Alvarado YC, Galina CS, Castilla B, Leon H, Moreno-Mendoza N; 2004. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the Tunel technique. *ReprodDomestAnim*. 39(3):141-145.
- Marti E, Perez-Pe R, and Colas C; (2008). Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci*, 106:113–132.
- Martin G, Sabido O, Durand P and Levy R; 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod*. 71,28–37.
- Martino A, Pollard A and Leibo SP; 1996a. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Devel*. 45: 503-512.
- Massip A, Leibo SP and Blesbois E; 2004. Cryobiology of gametes and the breeding of domestic animals. In: *Life in the Frozen State*, (Fuller, B. J., Lane, N., and Benson E. E., eds.), , CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 371–392.
- Maxwell WM and Johnson LA; 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev*. 46: 408–418.

- Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL; 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 57:327–344.
- Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ; 2013 *Cryobiology* 47, 73-81.
- Muhammad Anzar, Liwei He, Mary M. Buhr, Thomas G. Kroetsch, and Karl P. Pauls; 2002. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. *Biology Of Reproduction*. 66, 354–360.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF and Nottle MB;1994. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod*; 51: 618-622.
- Neglia G, Marino M, Di Palo R, Wilding M, Caracciolo di Brienza V, Dale B, Gasparini B, Zicarelli L; 2001. A comparison of in vitro maturation in buffalo (*Bubalus Bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. *Theriogenology*. 55: 488.
- Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*; 35: 109-124.
- Niu Y, Jianjun D, Chen Y, Wu C, Zhang S, Zhang D; 2016. Positive effect of apoptotic inhibitor Z-VAD-FMK on vitrified-thawed porcine MII stage oocytes. *Cryoletters*; 37(3):188–195.
- Noiles E, Bailey JL, Storey BT; 1995. Temperature dependence of the water permeability,  $L_p$ , of murine sperm shows a discontinuity between 4° and 0°C. *Cryobiology*. 32: 220–238.
- O'Kearney-Flynn M, Wade M, Duffy P, Gath V, Boland MP. and Dobrinsky JR; 1998. Effect of cryopreservation on IVP cattle embryo development in vitro and in vivo. *Theriogenology*. 49: 178.
- Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ, et al; 2004. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *BiolReprod*. 71:1828-1837.
- Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, et al; 2006. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. . 14(2):125- 131.
- Parks JE and Graham JK; 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38: 209–222.
- Paschoal DM, Sudano MJ, Schwarz KR, Maziero RR, Guastali MD, Crocomo LF, et al; 2017. Cell apoptosis and lipid content of in vitro-produced vitrified bovine embryos treated with forskolin. *Theriogenology*. 87:108-114.
- Paynter SJ; 2005. A rational approach to oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online*. 10:578–86.

- Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez, Martinez H; 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci.* 78:85 F98.
- Perloff WH, Steinberger E and Sherman JK; 1964. Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technic. *Fertil. Steril.* 15: 501-504.
- Peter AT, Colenbrander B, Gadella BM; 2005. Effect of caspase inhibitors on the post Fthaw motility, and integrity of acrosome and plasma membrane of cryopreserved equine spermatozoa. *Indian J Exp Biol.* 43:483 F7.
- Peter AT, Linde F and Forsberg C; 2003. Efficacy of the anticaspase agent zVADFmk on post Fthaw viability of canine spermatozoa vi et al.
- Polge C, Smith AU and Parks AS; 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 164: 666.
- Polge C, Smith AU and Parks AS; 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 164: 666.
- Pomar FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B, et al; 2005. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology.* 63:2254-2268.
- Ptak G, Dattena M, Loi P, Tischner M. and Cappai P; 1999. Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology.* 52: 1105-1114.
- Rajaei F, Karja NW, Agung B, Wongsrikeao P, Taniguchi M, Murakami M, Sambuu R et al; 2005. Analysis of DNA fragmentation of porcine embryos exposed to cryoprotectants. *Reprod Domest Anim.* 40(5):429-432.
- Rall WF 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology.* 24: 387-402.
- Rall WF and Fahy GM; 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature.* 313: 573-575.
- Rall WF; 2001. Cryopreservation of mammalian embryos, gametes and ovarian tissues. Current issues and progress. In: *Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals.* DP Wolf, M Zelinski-Wooten eds, Human Press, Towata, NJ: 173-187.
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G 2002; Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol;* 192:131-137.
- Reed JC; 1997a. Cytochrome c: can't live with it—can't live without it. *Cell.* 91,559-562.

- Ruffing NA, Steponkus PL, Pitt RE and Parks JE; 1993. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology*. 30:562–580.
- Ruppert-Lingham CJ, Paynter SJ, Godfrey J, Fuller BJ, Shaw RW; 2006. Membrane integrity and developmental of immature murine cumulus–oocyte complexes following slow cooling to  $-60^{\circ}\text{C}$ : the effect of immediate rewarming, plunging into LN2 and two controlled-rate-stage cooling. *Cryobiology*. 52:219–27.
- Saleem M, Qadir M, Perveen N, Ahmad B, Saleem U, Irshad T, Ahmad T; 2013. Inhibitors of Apoptotic Proteins: New Targets for Anticancer Therapy *Chem and Biol*.82: 243-251.
- Sherman JK and Bunge RG; 1953. Observations on preservation of human spermatozoa at low temperatures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82: 686-688.
- Smolewski P and Robak T; 2011. Inhibitor of apoptosis proteins(IAPs) as potential molecular targets for therapy of hematological malignancies. *Curr Mol Med* 11:633-49.
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, Dinnye A, Nagai T, Kikuchi K; 2007. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage *Cryobiology*. 55:115–126.
- Soto P, Natzke RP, Hansen PJ; 2003. Actions of tumor necrosis factor- $\alpha$  on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am J Reprod Immunol*. 50:380-388.
- Stroh C, Cassens U, Samraj AK, Sibrowski W, Schulze-Osthoff K, Los M; 2002. The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells. *Fed Am SocExpBiol*. 16:1651-1653.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M et al; 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 397,441–446.
- Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Longobardi S, and Gualtieri R; 2013. Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation *Reprod Biol Endocrinol*. 11: 81.
- Tharasanit T, Yamaji YF, Kleinhans FW, Magosaburo K, Colenbrander B, Stout TAE; 2006. Effect of maturation stage at cryopreservation on post-

- thaw cytoskeleton quality and fertilizability of equine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 73:627–637.
- Toner M, Cravalho EG and Karel M; 1990. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. *Journal of Applied Physics.* 67 1582–1593.
- Tosic, J; 1947. Mechanism of hydrogen peroxide formation by spermatozoa and the role of aminoacids in sperm motility. *Nature.* 159:544.
- Traldi AS; 2000. Vitrification of goat in vivo and in vitro produced embryos. In: *Proc. 7th Int. Conf. Goats.* Tours, France. 1031.
- Uysal O, Bucak MN, Yavas I, Varish O; 2007. Effect of various antioxidants on the quality of frozen- thawed bull semen. *J. Anim. Vet. Adv.* 6:12 1362-1366.
- Vajta G and Kuwayama M; 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology.* 65:236–244.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H; 1997a. Survival and development of in vitro produced bovine blastocysts following assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. *J Reprod and Fertil.* 111: 65-70.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T and Callesen H; 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53-58.
- Vallorani C, Spinacia M, Buccia D, Porcub E, Tamaninia C, Galeatia G; 2012. Pig oocyte vitrification by Cryotop method and the activation of the apoptotic cascade.
- Van der Elst J, Verheyen G and Van Steirtegehem A; 1997. Cryoconservation: Sperms and Oocytes. *Manual on Assisted Reproduction*, Rabe T., Diedrich K., Runnebaum B. (ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 223-251.
- Warner CM, Cao W, Exley GE, McElhinny AS, Alikani M, Cohen J; 1998. Genetic regulation of egg and embryo survival. *Hum Reprod.* 13:178-190.
- Willadsen SM; 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during-freezing and thawing. *Ciba Found Symp.* 52: 175-201.
- Wilmot I and Rowson LEA; 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92: 686-690.
- Wongsrikeao P, Kanashige Y, Ooki R, Taniguchi M, Agung B, Nii M, et al; 2005. Effect of removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes. *Reprod Dom Anim.* 40:166–170.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR; 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 68:251–306.

- Yoneda A, Suzuki K, Mori T, Ueda J, Watanabe T; 2004. Effects of delipidation and oxygen concentration on in vitro development of porcine embryos. *J Reprod Dev*; 50:287–295.
- Zenzes MT, Bielecki R, Camper RF, Leibo SP; 2001. Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertility and Sterility*. 75: 769-777.
- Zeron Y, Pearl M, Borochoy A, Arav A; 1999. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology*. 38(1): 35-42.
- Zhang L, Barry DM, Denniston RS, Bunch TD, and Godke RA; 1993. Birth of live calves after transfer of frozen-thawed bovine embryos fertilised in vitro. *Vet. Rec.*132: 247-249.
- Zhao XM, Hao HS, Du WH, Zhao SJ, Wang HY, Wang N, Wang D, Liu Y, Qin T, Zhu HB; 2015 *J Pineal Res* 12290.
- Zhivotovsky B, Burgess DH, Vanagas DM, Orrenius S; 1997. Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. *Biochem Res Commun*. 230:481-488.

## **Capitolo 3**

Esperimento 1: Influenza dell'inibitore della caspasi,  
Z-VAD-FMK, sulla criotolleranza degli embrioni bovini  
prodotti in vitro





### 3.1 Materiali e metodi

#### 3.1.1 Disegno sperimentale

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare se il trattamento con l'inibitore delle caspasi, Z-VAD-FMK, prima, durante e dopo la vitrificazione migliora la capacità e la vitalità alla sopravvivenza post-scongelo degli embrioni di bovino prodotti in vitro. Per valutare gli effetti dell'inibizione dell'apoptosi sulla crioconservazione e sulla morfologia degli embrioni bovini, quest'ultimi sono stati prodotti in vitro secondo la procedura standard (descritta di seguito). Il giorno 7 di coltura (giorno 0 = IVF) le blastocisti ottenute sono state pretrattate per 1 ora, vitrificate/riscaldare e messe in coltura per 48 ore in assenza (controllo n=182) e in presenza di 20  $\mu$ M dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK (trattato n=155). L'esperimento è stato ripetuto nove volte. Pertanto, nel gruppo trattato, Z-VAD-FMK è stato aggiunto nel terreno di aspirazione (per 1 ora prima della vitrificazione), nei terreni di vitrificazione e di riscaldamento e nel terreno di coltura (48 ore coltura post-riscaldamento). Per entrambi i gruppi, le blastocisti vitrificate sono state valutate per i seguenti parametri: sopravvivenza, progressione allo sviluppo e percentuali di schiusa dopo 24 e 48 ore di coltura di post-riscaldamento. Per ogni replica e per ogni gruppo, le blastocisti avanzate con blastocite e nodo embrionale chiaramente visibile, cioè blastocisti espanse (XBL) e blastocisti sgusciate (HBL), che sono sopravvissute sia al riscaldamento che dopo le 48 ore di coltura, sono state sottoposte alla colorazione TUNEL combinata con il Differential Staining (DS) per valutare rispettivamente la frammentazione del DNA e l'allocazione delle cellule embrionali nel nodo embrionale e nel trofotoderma. A tale fine sono state utilizzate solo blastocisti avanzate perché le differenze nel numero e nell'allocazione delle cellule delle blastocisti sono visibili quando vengono raggiunti gli stadi più avanzati (Korhonen et al., 2010). Poiché la colorazione immunostochimica per valutare la presenza di caspasi 3 attivata non è influenzata dallo stadio embrionale, questa valutazione è stata effettuata su tutte le blastocisti sopravvissute allo scongelamento e alla coltura 48 ore post-scongelo, cioè blastocisti precoci (eBL), blastocisti (BL), XBL e HBL.

### 3.1.2 Terreni e reagenti

Tutti i prodotti chimici sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich/Merck (Milano, Italia) se non diversamente specificato. La Dnasi RNA-free e la RNase A sono state ottenute da Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, USA), mentre l'inibitore della caspasi Z-VAD-FMK da Promega Corporation (Madison, WI, USA). Il terreno di aspirazione usato è stato il TCM 199 con 25 mM di HEPES, 2 mM di bicarbonato di sodio, 2 mM di piruvato di sodio, 1 mM di L-Glutammina, 10 µl/ml di amfotericina B (H199), supplementato con 2% di siero bovino adulto e 95.6 SI/ml di eparina. Per il terreno di maturazione è stato usato il TCM 199 con 15% BS, 0,5 µg/ml di FSH, 5 µg/ml di LH, 0,8 mM di L-Glutammina e 50 µg/ml di gentamicina. Per il terreno di fecondazione è stato utilizzato il Talp senza glucosio e BSA, supplementato con 5,3 SI/ml di eparina, 30 µM di penicillamina, 15 µM di ipotaurina, 1 µM di epinefrina e 1% di BS. Lo Sperm-Talp è stato usato per la separazione del seme. Il SOF conteneva 30 µl/ml di aminoacidi essenziali, 10 µl/ml di aminoacidi non essenziali e 5% di BS. La soluzione madre (20 mM in DMSO) dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK è stata aliquotata e congelata fino al giorno dell'utilizzo. Per ottenere la concentrazione desiderata (20 µM) e per ridurre al minimo la quantità di DMSO, durante il pretrattamento, la vitrificazione, il riscaldamento e la coltura post-riscaldamento, la soluzione madre di Z-VAD-FMK è stata diluita 1:1000 nei vari terreni, diluizione precedentemente dimostrata priva di tossicità per gli embrioni bovini (Stinshoff et al., 2014). Analogamente, nel gruppo controllo è stato aggiunto nei vari terreni il DMSO (1:1000) in assenza dell'inibitore. Il terreno utilizzato durante il pre-trattamento è stato H199 con il 5% BS, mentre il terreno base per la vitrificazione e le soluzioni di riscaldamento sono stati preparati partendo dal H199 con il 20% di siero bovino fetale (FCS). Il terreno di equilibrio (VS1) era costituito dal 7,5% di DMSO e 7,5% di EG nel terreno base; la soluzione di vitrificazione (VS2) consisteva nel 16,5% di DMSO, 16,5% di EG e 0,5 M di saccarosio nel terreno base. Le soluzioni di riscaldamento utilizzate sono state 0,25 M e 0,15 M di saccarosio nel terreno base.

### 3.1.3 Produzione Embrionale In Vitro

Le ovaie bovine sono state recuperate presso un mattatoio locale e trasportate in laboratorio, in soluzione fisiologica a 30-35° C. I complessi

cumulo-ovocita (COC) sono stati aspirati da follicoli di 2-8 mm di diametro e solo quelli con citoplasma uniforme e con differenti strati di cellule del cumulo sono stati selezionati e, lavati due volte nel terreno di aspirazione e una volta nel terreno di maturazione. Gruppi di 25 COC sono stati messi in maturazione in 400  $\mu$ l di terreno di maturazione, coperti con olio minerale, in piastre a quattro pozzetti (Nunc<sup>TM</sup>, Roskilde, Danimarca), per 22 ore a 39°C in presenza del 5% di CO<sub>2</sub>. I COC maturati in vitro sono stati lavati e trasferiti, 25 per pozzetto, in 300  $\mu$ l di terreno di fecondazione coperti da olio minerale. Il seme congelato, proveniente da un toro con una buona fertilità in vitro, già precedentemente esaminato e testato per l'IVF nel nostro laboratorio, è stato scongelato a 37° C per 40 secondi ed è stato selezionato tramite centrifuga (25 min a 300g) su gradienti di Percoll (45 e 80%). Il pellet è stato risospeso in 2 ml di Sperm-Talp e centrifugato due volte, a 160 e 108g per 10 minuti. Il pellet, così ottenuto, è stato poi diluito con l'IVF e aggiunto nei pozzetti di fecondazione alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  spermatozoi/ml. È stata fatta una co-incubazione dei gameti per 20 ore a 39°C, in 5% CO<sub>2</sub>, dopodiché i presunti zigoti sono stati vortexati in TCM HEPES con 5% BS per 2 minuti per rimuovere le cellule del cumulo, lavati due volte nello stesso terreno e messi in coltura, 30-50 per pozzetto, in 400  $\mu$ l di terreno di coltura, posti in una camera modulare con il 5% di CO<sub>2</sub>, 7% O<sub>2</sub> e 88% N<sub>2</sub> ad una temperatura di 39°C. Al giorno 7 sono stati valutati i tassi di cleavage e delle blastocisti. Gli embrioni ottenuti sono stati selezionati per la qualità sulla base di criteri morfologici (Robertson e Nelson, 2010) e sono state registrate le percentuali di blastocisti di grado 1 e 2, calcolate sul totale dei COC e sugli embrioni divisi. Inoltre lo stadio di sviluppo è stato valutato come segue: eBL, BL, XBL e HBL.

### *3.1.4 Vittrificazione e scongelamento*

Al settimo giorno le blastocisti di grado 1 e 2 (eBL, BL e XBL) sono state vittrificate e riscaldate con il metodo Cryotop precedentemente descritto (Kuwayama e Kato, 2000). Tutti gli step di equilibrio e diluizione sono stati effettuati a 37°C. Le blastocisti sono state esposte alla soluzione VS1 in gocce di 200  $\mu$ l per 3 minuti, trasferiti in una goccia da 20  $\mu$ l di VS2 per 20-25 secondi, e caricate tramite un capillare di vetro sul Cryotop in 0,1  $\mu$ l di volume finale. Dopo il caricamento, quasi tutta la soluzione è stata rimossa e il Cryotop è stato rapidamente immerso in azoto liquido, protetto con il tappo e conservato in azoto. Per il riscaldamento, dopo la rimozione del tappo, il Cryotop è stato immerso direttamente in 1 ml della soluzione di

saccarosio 0,25 M per 1 minuto e l'embrione è stato trasferito in gocce di 200 µl di 0,15 M di saccarosio per 5 minuti. Le blastocisti riscaldate sono state lavate nel terreno H199 +10% FCS e messe in coltura per due giorni. Dopo 24 e 48 ore di coltura post-riscaldamento sono stati valutati i tassi di sopravvivenza basandosi su criteri morfologici, sulla base di una buona morfologia, assenza di cellule necrotiche, riespansione del blastocele (Cohen et al., 1986) e integrità della zona pellucida. Inoltre, sono state registrate le percentuali di embrioni che hanno ripreso il loro sviluppo e sono andati avanti negli stadi successivi dopo la coltura (tasso di sviluppo), così come la percentuale di embrioni sgusciati.

### *3.1.5 Differential Staining e valutazione della frammentazione del DNA, mediante Colorazione Tunel*

Le blastocisti (XBL e HBL), di entrambi i gruppi, sopravvissute alla vitrificazione sono state sottoposte a Differential Staining combinato con il protocollo Tunel, precedentemente descritto (Fouladi-Nashta et al., 2005), cui sono state apportate lievi modifiche. Brevemente, la zona pellucida delle XBL vitali è stata rimossa con 0,2% di pronase in SOF tamponato con HEPES. Dopo tre lavaggi in PBS con lo 0,1% di polivinilpirrolidone (PVP), le blastocisti sono state incubate in una soluzione, preparata poco prima dell'utilizzo, di 0,2% Triton X-100 in PBS-PVP per 20 secondi per consentire una parziale permeabilizzazione, e immediatamente lavate per due volte in PBS-PVP. Per impedire la colorazione del RNA da parte dello ioduro di propidio (PI), gli embrioni sono stati prima incubati con RNase A (50 µg/ml in PBS-PVP) per 1 ora a 37°C al buio e poi sono stati trasferiti in PBS-PVP contenente 30 µg/ml di PI ed incubati al buio per 5 minuti a 37°C. Dopo due lavaggi in PBS-PVP, gli embrioni sono stati incubati in paraformaldeide al 4% (PFA) contenente 10 µg /ml di bis-benzimide (Hoechst 33342) per 30 minuti a temperatura ambiente (RT), e sottoposti a due lavaggi in PBS-PVP. Successivamente, gli embrioni sono stati permeabilizzati in una soluzione, preparata poco prima dell'utilizzo, di 0,1% Triton X-100 con 0,1% di sodio citrato (v/v) per 5 minuti in ghiaccio e poi sono stati lavati per due volte in PBS-PVP. Il kit Tunel (In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein) è stato utilizzato secondo le istruzioni. Gli embrioni sono stati incubati nella miscela di reazione della Tunel con una diluizione 1:10 della soluzione enzimatica (deossinucleotidiltrasferasi terminale) in camera umida per 45 minuti a 37°C al buio. I controlli positivi e negativi per il saggio Tunel, sono stati precedentemente incubati in 50 µl

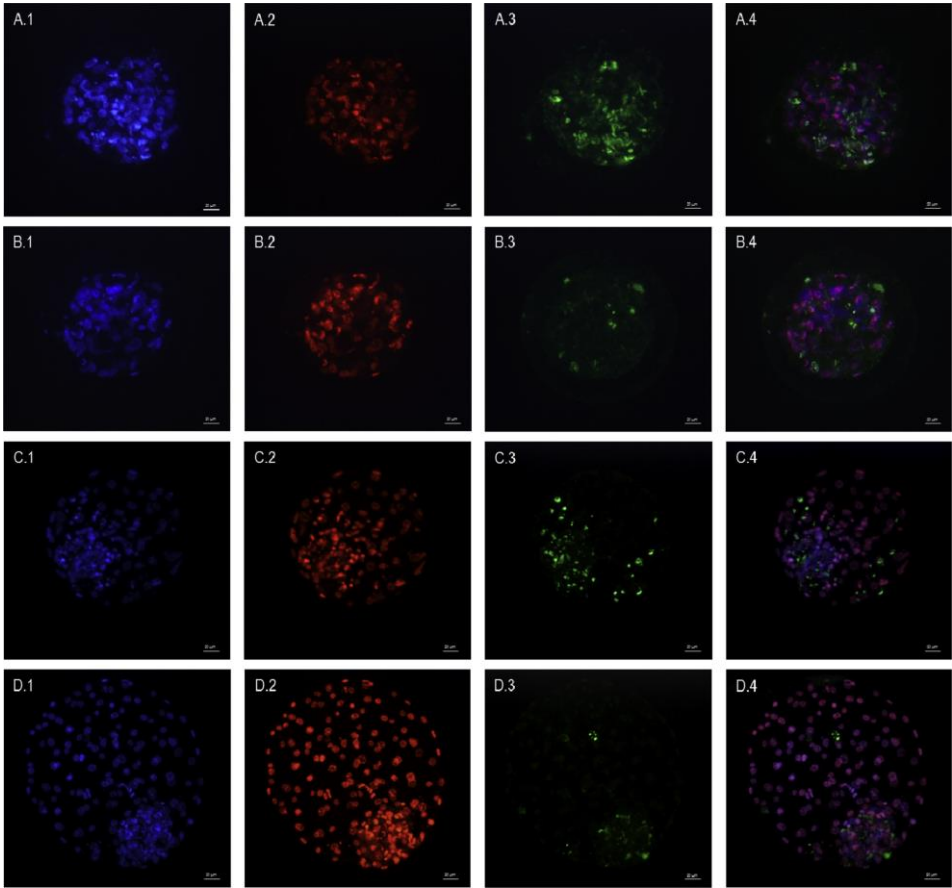
di RQ1-RNA free DNase (50 U/ml) a 37°C al buio per 15 minuti. Dopo il lavaggio in PBS-PVP, i controlli positivi sono stati incubati in gocce della miscela TUNEL contenente la fluoresceina isotiocianato-coniugata dUTP e l'enzima per 45 minuti a 37°C al buio. I controlli negativi sono stati invece incubati in assenza dell'enzima. Gli embrioni fissati e colorati sono stati lavati tre volte in PBS-PVP, montati su vetrino per microscopio in una goccia di glicerolo e coperti con un vetrino coprioggetto in modo da posizionare tutti i nuclei sullo stesso piano focale. Successivamente, ogni embrione è stato analizzato usando un microscopio a fluorescenza (Eclipse E-600; Nikon, Japan) sotto luce ultravioletta con filtro di eccitazione DAPI (460 nm per la fluorescenza blu e rossa), TRITC (532 nm solo per il rosso) e filtri FITC (520 nm). Le immagini digitali di ciascun embrione sono state acquisite utilizzando il software NIS-Elements-F e una fotocamera digitale a colori ad alta risoluzione (Digital Sight DS-Fi 1C; Nikon, Japan) sono stati conteggiati le cellule del trofotoderma (TE) (rosso), del nodo embrionale o massa cellulare interna, i.e. ICM (blu) e i nuclei Tunel-positivi (verde) (Figura 3.1). Inoltre, è stata registrata la percentuale di blastocisti con livelli bassi (< 5%), medi (5-10%) e alti (> 10%) di frammentazione del DNA.

### *3.1.6 Immunoistochimica per Caspasi 3*

Gli embrioni stoccati in base allo stadio di sviluppo (eBL, BL, XBL e HBL; Robertson e Nelson 2010), sono stati fissati in una soluzione di paraformaldeide al 4% (PFA) in PBS a temperatura ambiente per 45 minuti, lavati e stoccati in PBS-PVP a 4°C fino al momento dell'utilizzo. Il giorno della colorazione immunoistochimica, gli embrioni fissati sono stati lavati in PBS-PVP, permeabilizzati in una soluzione di bloccaggio (blocking buffer) composta da PBS con il 10% di siero di capra, 0,1% di BSA e 0,5% di Triton X-100 per 1 ora a temperatura ambiente e successivamente incubati con un anticorpo primario per caspase 3 (D-175, RabbitmAb 9664S, Cell Signaling Technology) diluito nel blocking buffer (1:50), per tutta la notte. Gli embrioni sono stati lavati in PBS-PVP e incubati con un anticorpo secondario FITC (anti-rabbitIgG-FITC) diluito in blocking buffer (1:1000), per 2 ore a temperatura ambiente. Infine, gli embrioni sono stati lavati in PBS-PVP e montati su un vetrino per microscopio, e coperti con un vetrino coprioggetto in una soluzione di colorazione 4,6-diamidino-2-fenylindole (DAPI) (H-1200, VectaShield; VectorLaboratories, Inc., Burlingame, CA 94010). Il controllo negativo della colorazione immunoistochimica è stato effettuato tramite l'omissione dell'anticorpo primario. La colorazione è stata

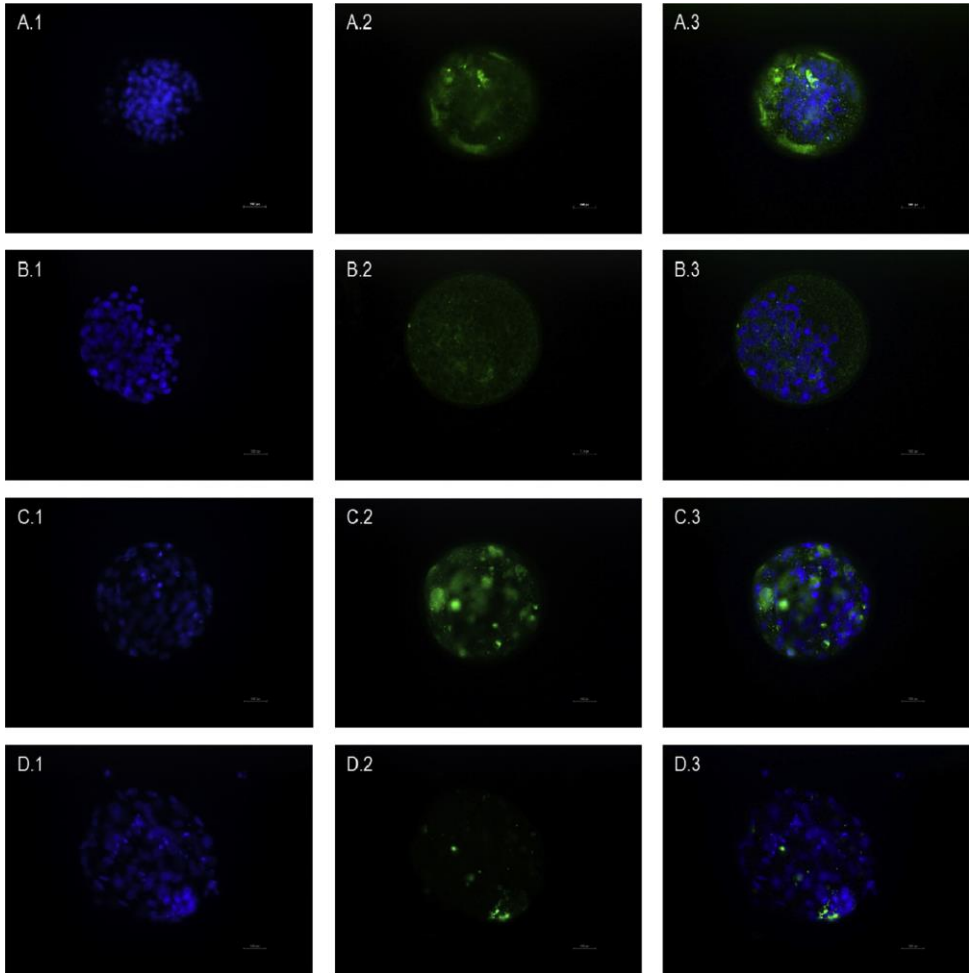
visualizzata utilizzando un microscopio fluorescente (Eclipse E-1000; Nikon, Japan) sotto la luce ultravioletta con filtri di eccitazione DAPI (460 Nm per fluorescenza blu) e FITC (520 nm) acquisiti con una fotocamera Digital Sight DS-Fi 1C (Nikon, Japan), utilizzando un obiettivo 20x. Le immagini acquisite (Figura 3.2) sono state analizzate utilizzando Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MA). L'area totale dell'embrione e le aree interessate dall'attività delle caspasi 3 dei singoli embrioni sono state delineate manualmente con lo strumento di selezione poligono e misurate sulle immagini acquisite dal canale FITC. Il background di fondo e i legami aspecifici sono stati rimossi calcolando la media dei pixel per i controlli delle IgG e sottraendo questi valori dalla intensità media individuale dei pixel degli embrioni. Inoltre, sono state rimosse le aree che non corrispondevano all'embrione, comprese le aree all'interno dell'embrione tra le cellule e, le regioni dell'embrione che presentavano una rottura della zona pellucida, nei casi in cui ciò si verificava.

## Esperimento 1



*Fig. 3.1 Immagini di blastocisti bovine al giorno 7 vitrificate/riscaldiate in assenza (controllo) (A.1-A.4 e C.1-C.4) o in presenza di 20  $\mu$ M Z-VAD-FMK (B.1-B.4 e D.1-D.4). La tecnica Tunel combinata con differential staining è stata eseguita sia al riscaldamento (A.1-B.4) che dopo 48 ore di coltura (C.1-D.4). Le colorazioni Hoechst (blu), Ioduro di Propidio (rosso) e Tunel (verde) sono state esaminate con filtri DAPI, TRITC e FITC, per le cellule totali (A.1, B.1, C.1, D.1), il trofocderma (A.2, B.2, C.2, D.2) e le cellule apoptotiche (A.3, B.3, C.3, D.3). Una sovrapposizione viene visualizzata in A.4, B.4, C.4 e D.4 (ingrandimento di 20x; bar: 20  $\mu$ m).*

## Esperimento 1



*Fig. 3.2 Immagini di blastocisti bovine al giorno 7 vitrificati/riscaldati in assenza (controllo) (A.1-A.4 e C.1-C.4) o in presenza di 20  $\mu$ M Z-VAD-FMK (B.1-B.4 e D.1-D.4) sia al riscaldamento (A.1-B.3) che a 48 ore di coltura (C.1-D.3). La fluorescenza dell'anticorpo anti-caspase-3 (verde) è stata esaminata tramite il filtro FITC per la caspasi (A.2, B.2, C.2, D.2), mentre la colorazione DAPI (blu) è stata esaminata tramite il filtro DAPI per le cellule totali (A.1, B.1, C.1, D.1). È stata effettuata una sovrapposizione (A.3, B.3, C.3 e D.3) (ingrandimento 20x; bar: 100 pixel).*



### 3.2 Analisi statistica

Le percentuali di sopravvivenza, sviluppo e schiusa dopo la coltura post-riscaldamento sono state confrontate, tra il gruppo controllo e il gruppo trattato con Z-VAD-FMK, tramite il Test Chi Quadrato. Differenze tra i gruppi nel numero di cellule, distribuzione nei foglietti embrionali, frammentazione del DNA e livello di caspasi 3 nella forma scissa sono stati analizzati tramite il test t di Student. La percentuale di blastocisti con diversi livelli di frammentazione del DNA (basso, medio e alto) nei due gruppi sono stati analizzati tramite il Test Chi Quadrato.

### 3.3 Risultati

Le percentuali di cleavage (divisione a 2 cellule) e di blastocisti, calcolate sul totale dei COC e sugli embrioni divisi (media  $\pm$  SE), erano  $81,2 \pm 1,1$ ,  $29,5 \pm 1,5$  e  $36,4 \pm 1,9$ , rispettivamente, su nove repliche. Come riportato nella Tabella 3.1, il trattamento con  $20 \mu\text{M}$  dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK, ha migliorato la criotolleranza degli embrioni rispetto al controllo, come indicato dall'aumento delle percentuali di sopravvivenza ( $P < 0,01$ ) e di sviluppo ( $P < 0,01$ ) sia a 24 che a 48 ore di coltura post-riscaldamento e dall'aumento delle percentuali di schiusa ( $P < 0,05$ ) a 48 ore di coltura dopo il riscaldamento. Vale la pena sottolineare che la distribuzione differenziale delle cellule dell'ICM e del TE nelle blastocisti al riscaldamento (tempo 0) non è risultata possibile, dato che gli embrioni avevano recuperato solo parzialmente la loro forma sferica, e non c'era modo di distinguere chiaramente l'ICM e il blastocoele (Tabella 3.2). Non sono state registrate differenze tra i gruppi nel numero medio di ICM, TE e cellule totali, così come nel rapporto delle ICM sulle cellule totali a 48 ore di coltura post-riscaldamento (Tabella 3.2). Al contrario, sia il numero medio che la percentuale di cellule con DNA frammentato è diminuita nelle blastocisti ( $P < 0,01$ ) trattate con Z-VAD-FMK rispetto al controllo al riscaldamento e dopo 48 ore di coltura (Tabella 3.3). L'esposizione delle blastocisti a  $20 \mu\text{M}$  di Z-VAD-FMK ha ridotto ( $P < 0,01$ ) il numero e la percentuale delle cellule con DNA frammentato sia all'interno dell'ICM che nel TE delle blastocisti dopo 48 ore di coltura post-riscaldamento (Tabella 3.3). La maggior parte dei nuclei frammentati era situata nella regione dell'ICM in entrambi i gruppi (68,7 e 69,3%, rispettivamente nel controllo e nel gruppo Z-VAD-FMK). Inoltre, l'aggiunta di Z-VAD-FMK ha comportato un aumento ( $P < 0,01$ ) della percentuale di blastocisti con bassi livelli di frammentazione del DNA ( $< 5\%$ ), e una diminuzione ( $P < 0,01$ ) della percentuale di blastocisti con livelli medi di frammentazione del DNA (5%- 10%) (Figura 3.3), sia al riscaldamento che a 48 ore di coltura post-riscaldamento. Inoltre, nel gruppo arricchito con Z-VAD-FMK non sono state trovate blastocisti con alti livelli di frammentazione del DNA ( $> 10\%$ ) dopo riscaldamento e a 48 ore di coltura post-riscaldamento, mentre queste sono state osservate nel controllo dopo il riscaldamento (2,9%) e a 48 ore di coltura post-riscaldamento (7,9%), come mostrato in Figura. 3.2. Infine, sia le aree di fluorescenza (pixel2) interessate dall'attività delle caspasi 3 che la percentuale relativa alla superficie totale delle blastocisti risultavano ridotte

( $P < 0,01$ ) in presenza di 20  $\mu\text{M}$  dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK, sia al riscaldamento che a 48 ore di coltura post-riscaldamento (Tabella 3.4).

## Esperimento 1

Tab. 3.1 Sopravvivenza, sviluppo e schiusa dopo 24 e 48 ore post-riscaldamento di blastocisti in assenza (Controllo) o presenza di Z-VAD-FMK

Stadio embrionale	Gruppi	n.	24 ore post-riscaldamento			48 h ore post-riscaldamento		
			Sopravvivenza n. (%)	Sviluppo n. (%)	Schiusa n. (%)	Sopravvivenza n. (%)	Sviluppo n. (%)	Schiusa n. (%)
Blastocisti precoci	Controllo	100	69 (69.0) <sup>A</sup>	31 (31.0) <sup>a</sup>	1 (1.0)	44 (44.0) <sup>A</sup>	34 (34.0) <sup>A</sup>	7 (7.0) <sup>a</sup>
	Z-VAD	91	78 (85.7) <sup>B</sup>	42 (46.2) <sup>b</sup>	3 (3.3)	60 (65.9) <sup>B</sup>	48 (52.7) <sup>B</sup>	15 (16.5) <sup>b</sup>
Blastocisti	Controllo	54	40 (74.1) <sup>A</sup>	19 (35.2) <sup>a</sup>	1 (1.9)	33 (61.1) <sup>A</sup>	24 (44.4) <sup>A</sup>	14 (25.9)
	Z-VAD	46	43 (93.5) <sup>B</sup>	27 (58.7) <sup>b</sup>	4 (8.7)	43 (93.5) <sup>B</sup>	38 (82.6) <sup>B</sup>	15 (32.6)
Blastocisti espanse	Controllo	28	17 (60.7) <sup>a</sup>	7 (25.0)	5 (17.9)	16 (57.1)	12 (42.9)	11 (39.3)
	Z-VAD	18	16 (88.9) <sup>b</sup>	9 (50.0)	6 (33.3)	15 (83.3)	12 (66.7)	11 (61.1)
Totale	Controllo	182	126 (69.2) <sup>A</sup>	57 (31.3) <sup>A</sup>	7 (3.9)	93 (51.1) <sup>A</sup>	70 (38.5) <sup>A</sup>	32 (17.6) <sup>a</sup>
	Z-VAD	155	137 (88.4) <sup>B</sup>	78(50.3) <sup>B</sup>	13 (8.4)	118 (76.1) <sup>B</sup>	98(63.2) <sup>B</sup>	41 (26.5) <sup>b</sup>

<sup>A, B</sup> I valori all'interno di una colonna con apice differente indicano differenze significative a P <0,01

<sup>a, b</sup> I valori all'interno di una colonna con diverso apice indicano differenze significative a P <0,05

## Esperimento 1

*Tab. 3.2 Distribuzione delle cellule (mean  $\pm$  SE) nel nodo embrionale (ICM) e nel trofotoderma (TE) al giorno 7 di blastocisti bovine vitrificate a 0 e 48 ore post riscaldamento in assenza (Controllo) o presenza dell'inibitore delle caspasi (Z-VAD-FMK)*

<b>Gruppo</b>	<b>Tempo</b>	<b>n.</b>	<b>ICM</b>	<b>TE</b>	<b>Cellule totali</b>	<b>ICM cells (%)</b>	<b>ratio ICM:TE</b>
Controllo	0 h	35	-	-	109.0 $\pm$ 3.4	-	-
Z-VAD		35	-	-	116.3 $\pm$ 4.2	-	-
Controllo	48 h	38	23.4 $\pm$ 1.1	108.5 $\pm$ 5.5	131.9 $\pm$ 5.9	18.4 $\pm$ 0.9	0.23 $\pm$ 0.01
Z-VAD		38	24.4 $\pm$ 0.9	118.6 $\pm$ 5.0	143.0 $\pm$ 5.7	17.4 $\pm$ 0.4	0.21 $\pm$ 0,01

## Esperimento 1

*Tab. 3.3 Media (mean ± SE) e relative percentuali di frammentazione del Dna su cellule totali, nodo embrionale (ICM) e trofotoderma (TE) dopo 48 ore post-riscaldamento di in assenza (Controllo) o presenza di Z-VAD-FMK*

Gruppo	Tempo (ora)	n.	FRAMMENTAZIONE DNA (n)			FRAMMENTAZIONE DNA (%)		
			Total	ICM	TE	Total	ICM	TE
Controllo	0 h	35	6.1 ± 0.4 <sup>A</sup>	-	-	5.7 ± 0.4 <sup>A</sup>	-	-
Z-VAD		35	3.1 ± 0.2 <sup>B</sup>	-	-	2.7 ± 0.2 <sup>B</sup>	-	-
Controllo	48 h	38	7.7 ± 0.5 <sup>A</sup>	5.26 ± 0.31 <sup>A</sup>	2.39 ± 0.27 <sup>A</sup>	6.1 ± 0.5 <sup>A</sup>	25.55 ± 2.54 <sup>A</sup>	2.25 ± 0.27 <sup>A</sup>
Z-VAD		38	4.7 ± 0.3 <sup>B</sup>	3.26 ± 0.24 <sup>B</sup>	1.45 ± 0.15 <sup>B</sup>	3.4 ± 0.2 <sup>B</sup>	13.55 ± 0.99 <sup>B</sup>	1.29 ± 0.14 <sup>B</sup>

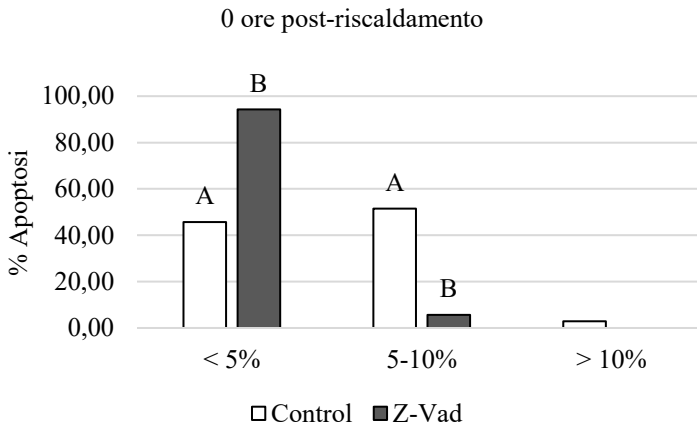
<sup>A,B</sup> I valori all'interno di una colonna con apice differente indicano differenze significative a P < 0,01

## Esperimento 1

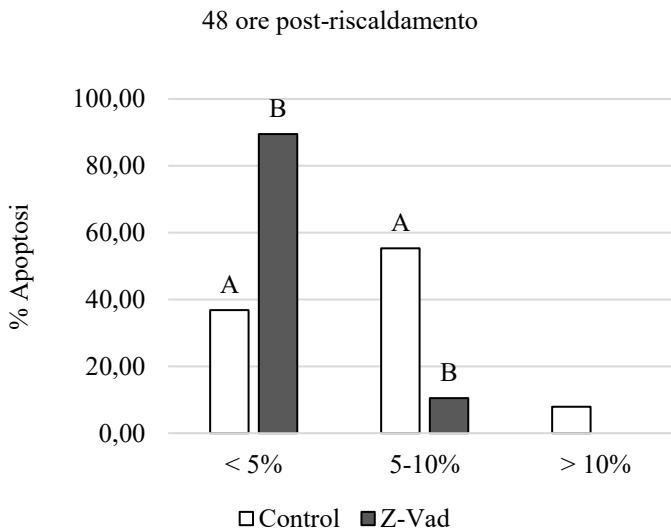
Tab. 3.4 Effetti di Z-VAD-FMK a 0 e 48 ore post-riscaldamento di blastocisti in assenza (Controllo) o presenza di Z-VAD-FMK

Gruppo	Tempo	n.	AREA TOT (pixels <sup>2</sup> )	AREA CASP-3 (pixels <sup>2</sup> )	% AREA CASP-3
Controllo	0 ore	27	183990.81 ± 8669.16	5474.15 ± 620.71 <sup>A</sup>	3.24 ± 0.46 <sup>A</sup>
Z-VAD		29	202647.93 ± 11390.69	2291.17 ± 207.88 <sup>B</sup>	1.29 ± 0.17 <sup>B</sup>
Controllo	48 ore	36	306443.25 ± 28174.71	13655.03 ± 1087.29 <sup>A</sup>	5.06 ± 0.41 <sup>A</sup>
Z-VAD		42	334915.17 ± 29905.85	4261.43 ± 444.36 <sup>B</sup>	1.46 ± 0.17 <sup>B</sup>

<sup>A,B</sup> I valori all'interno di una colonna con apice differente indicano differenze significative a P <0,01



a



b

<sup>A, B</sup> apici differenti indicano differenze significative  $P < 0,01$ .

*Fig. 3.3 Le percentuali di blastocisti con livelli bassi (<5%), medi (5-10%) e alti (> 10%) di apoptosi subito dopo il riscaldamento (a) e a 48 ore di coltura post-riscaldamento (b), nel gruppo controllo e nel gruppo Z-VAD-FMK*



### 3.4 Discussione

Il razionale di questo lavoro nasce dalle osservazioni che la ridotta vitalità degli embrioni prodotti in vitro dopo crioconservazione sia in parte dovuta ad una anormale attivazione del fenomeno dell'apoptosi (Park et al., 2006). Pertanto, lo scopo è stato quello di valutare se l'utilizzo di un inibitore dell'apoptosi Z-VAD-FMK, prima, durante e dopo la vitrificazione potesse avere degli effetti benefici sulla criotolleranza embrionale. Lo Z-VAD-FMK è un inibitore delle caspasi che si lega ai siti catalitici della caspasi 3, 8 e 9, impedendo l'attivazione dell'inziatore (caspasi 9 e 8) e/o dell'effettore (caspasi 3) della cascata apoptotica. I risultati del presente studio hanno dimostrato che il trattamento con l'inibitore della caspasi Z-VAD-FMK, migliora la criotolleranza degli embrioni bovini prodotti in vitro, prevenendo l'apoptosi indotta da crioconservazione. Infatti, la resistenza alla crioconservazione è aumentata negli embrioni trattati con Z-VAD-FMK, come dimostrato dalle maggiori percentuali di sopravvivenza, sviluppo e sguscio dopo 24 e 48 ore di coltura post-riscaldamento. Inoltre, l'esposizione degli embrioni a Z-VAD-FMK non ha modificato né il numero delle cellule né la distribuzione cellulare delle stesse all'interno dell'ICM e del TE, entrambe essenziali ai fini di un corretto sviluppo embrionale (Iwasaki et al., 1990; Koo et al., 2002; Knijn et al., 2003). È noto che la criotolleranza dell'embrione è un marker efficiente della qualità dell'embrione (Imai et al., 2002; Rizos et al., 2003) e che la percentuale di schiusa post-riscaldamento è il parametro più importante, poiché questo processo è probabilmente compromesso dopo la crioconservazione, a causa dell'indurimento della zona pellucida (Carroll et al., 1990; Matson et al., 1997). L'efficacia del trattamento con Z-VAD-FMK è stata maggiore in questo studio rispetto ad un lavoro precedente effettuato su embrioni porcini prodotti in vitro, in cui era stato riportato un miglioramento della morfologia dopo 18 ore di coltura, senza però alcun effetto sulla sopravvivenza e sui tassi di schiusa dopo 24 ore di coltura (Men et al., 2006). I nostri risultati sono in accordo con altri lavori precedenti, che avevano descritto un aumento della vitalità post-scongelo in diverse cellule di mammifero tramite l'inibizione dell'apoptosi indotta dalla crioconservazione (Stroh et al., 2002; Heng et al., 2007). La crioconservazione degli embrioni porta a differenti danni nelle cellule, come la rottura del citoscheletro (Dobrinsky, 1996), danni alla membrana (Wolfe e Bryant, 1999; Acker et al., 2001), oltre ad un aumento del DNA frammentato e apoptosi (Behr et al., 2002; Pomar et al., 2005; Park et al., 2006). Al fine di valutare se l'effetto di Z-VAD-

FMK sulla criotolleranza dell'embrione fosse effettivamente dovuto alla ridotta apoptosi, sono state valutate la frammentazione del DNA mediante colorazione Tunel e dell'attività della caspasi 3 mediante immunohistochimica. Sebbene la colorazione Tunel sia la tecnica attualmente più utilizzata per la valutazione dell'apoptosi negli embrioni nella fase del pre-impianto (Collins et al., 1997; Park et al., 2006; Zullo et al., 2016a; Zullo et al., 2016b), la sua specificità è bassa. Infatti, la Tunel identifica la frammentazione del DNA che è anche stata osservata in altri processi di morte cellulare, come nella necrosi (Baguisi et al., 2000). Pertanto, abbiamo studiato tramite l'immunohistochimica l'attività della caspasi 3, nota per essere a valle delle vie apoptotiche. La funzione di induzione alla morte mediata dalle caspasi è stata studiata da diversi autori negli embrioni pre-impianto di mammifero (Moley et al., 1998; Xu et al., 2001). In particolare, l'attivazione delle caspasi 3 gioca un ruolo fondamentale negli ultimi eventi della cascata apoptotica ed è anche conosciuta come il "punto di non ritorno" (Zhivotovsky et al., 1997).

È interessante notare che l'attività delle caspasi 3 e la frammentazione del DNA seguono lo stesso andamento sia al riscaldamento che dopo 48 ore di coltura post-riscaldamento, confermando l'efficacia di Z-VAD-FMK nell'inibire l'apoptosi. In particolare, i risultati di immunohistochimica hanno mostrato una riduzione delle aree interessate dall'attività delle caspasi 3, in linea con una diminuzione dell'indice di frammentazione del DNA evidenziato con la Tunel, in embrioni trattati con Z-VAD-FMK. Sebbene il numero di cellule totali ed il rapporto ICM:TE non sia stato alterato, il trattamento con Z-VAD-FMK ha determinato una riduzione del numero e della percentuale di cellule con DNA frammentato sia nelle regioni dell'ICM che del TE delle blastocisti, senza influenzare la distribuzione dei nuclei Tunel-positivi nelle regioni dell'embrione. Infatti, la maggior parte dei nuclei frammentati è stata rilevata nell'ICM, confermando studi precedenti (Marquez-Alvarado et al., 2004; Korhonen et al., 2010; Sudano et al., 2011). L'aumento della percentuale di blastocisti con un basso indice di frammentazione del DNA (<5%) nel gruppo trattato è un risultato importante, poiché un'alta incidenza di morte cellulare indica condizioni di coltura sub-ottimali e danni da congelamento (Park et al., 2006). Questi risultati presi insieme suggeriscono che un miglioramento della criotolleranza osservato nel gruppo Z-VAD-FMK potrebbe essere dovuto all'inibizione dell'apoptosi. Vale la pena ricordare che durante lo sviluppo embrionale l'apoptosi è fisiologica per eliminare le cellule difettose (Metcalf et al., 1999; Jurisicova et al., 1998), mentre un'anormale

percentuale dovuta a condizioni sub-ottimali è associata ad una scarsa qualità dell'embrione (Betts e King, 2001). È noto che l'apoptosi può essere indotta da diversi stimoli non fisiologici, comprese le variazioni di temperatura (Wyllie, 1981). La crioconservazione porta ad un aumento dello stress ossidativo, causando perossidazione lipidica, danni strutturali e alla membrana (Somfai et al., 2007), oltre a scatenare la cascata apoptotica (Yang et al., 1998; Guerin et al., 2001). Un ruolo cruciale dell'apoptosi nei danni da freddo della cellula è stato suggerito da Stroh et al., (2002) che hanno dimostrato che la crioconservazione induce l'attività pro-apoptotica delle caspasi 3 nelle cellule ematopoietiche e l'inibizione delle caspasi da parte di Z-VAD-FMK migliora la loro sopravvivenza post crioconservazione (Stroh et al., 2002). In questo esperimento, il miglioramento della criotolleranza e la normale morfologia dell'embrione in termini di numero e distribuzione delle cellule degli embrioni trattati, suggeriscono che l'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK ha mirato principalmente alle cellule danneggiate dall'apoptosi indotta da crioconservazione. Tuttavia, non è possibile escludere che l'inibizione della via dell'apoptosi, fondamentale per regolare il rinnovo e la proliferazione cellulare durante lo sviluppo embrionale, possa avere effetti collaterali a lungo termine. È importante sottolineare che nel nostro esperimento l'inibizione dell'apoptosi è parziale perché un livello basale di caspasi 3 attivata è stato rilevato anche negli embrioni trattati con Z-VAD-FMK, suggerendo che esiste un livello fisiologico di caspasi 3 attiva per assicurare lo sviluppo dell'embrione. Tuttavia, questa questione dovrebbe essere affrontata in studi futuri valutando lo sviluppo a termine di embrioni trattati con Z-VAD-FMK dopo il trasferimento embrionale. In conclusione, i risultati di questo studio hanno dimostrato che il trattamento degli embrioni bovini prodotti in vitro in presenza dell'inibitore della caspasi Z-VAD-FMK aumenta la criotolleranza dell'embrione, limitando l'apoptosi indotta da crioconservazione. Questa potrebbe essere una strategia semplice ed economica per migliorare l'efficienza della crioconservazione degli embrioni bovini, fondamentale per una maggiore diffusione della tecnologia di produzione embrionale in vitro in campo. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per valutare la vitalità dell'embrione a lungo termine, valutando la loro capacità di impianto e di gravidanza dopo il trasferimento degli embrioni, prima di possibili applicazioni commerciali.

- Baguisi A, Lonergan P, Overstrom E, Boland M; 2000. Vitrification of bovine embryos: incidence of necrosis and apoptosis. *Theriogenology*. 55:162.
- Behr B, Gebhardt J, Lyon J, Milki AA; 2002. Factors relating to a successful cryopreserved blastocyst transfer program. *FertilSteril*. 77:697-9.
- Betts DH, King WA. 2001 Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*;55:171e91.
- Carroll J, Depypere H, Mathews C; 1990. Freeze-thaw induced changes of the zonapellucida explain decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J ReprodFertil*. 90(2):547-53.
- Cohen J, Simons RS, Fehilly CB, Edwards RG; 1986. Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J Vitro Fert Embryo Transf*. 3(1):46-52.
- Collins JA, Schandi CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC; 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem*. 45:923-34.
- Dobrinsky JR; 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*. 45: 17-26.
- Fouladi-Nashta AA, Alberio R, Kafi M, Nicholas B, Campbell KHS, Webb R; 2005. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reprod Biomed Online*. 10(4): 497-502.
- Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y; 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*. 7:175e89.
- Heng BC, Clement MV, Cao T; 2007. Caspase inhibitor Z-VAD-FMK enhances the freeze thaw survival rate of human embryonic stem cells. *Biosci Rep*. 27(4e5):257-264.
- Imai K, Matoba S, Dochi O, Shimohira I; 2002. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. *J Vet Med Sci*. 64(10):887-891.
- Iwasaki S, YoshiBiba N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T; 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *J Reprod Fertil*. 90:279-284.
- Juriscova A, Latham KE, Casper RF, Varmuza SL; 1998. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *MolReprod Dev*. 51:243-253.
- Knijn HM, Gjorret JO, Vos P, Hendriksen PJM, van der Weijden BC, MaddoxHyttel P et al; 2003. Consequences of in vivo development and

- subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. *BiolReprod.* 69:1371-1378.
- Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB, et al; 2002. Aberrant allocations of inner cell mass and trophoctoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *BiolReprod.* 67(2):487-492.
- Korhonen K, Kananen K, Ketoja E, Matomäki J, Halmekyto M, Peippo J; 2010. Effects of serum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. *Reprod Dom Anim.* 45:42-49.
- Korhonen K, Kananen K, Ketoja E, Matomäki J, Halmekyto M, Peippo J; 2010. Effects of serum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. *Reprod Dom Anim.* 45:42-49.
- Kuwayama M and Kato O; 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 17, 477.
- Marquez-Alvarado YC, Galina CS, Castilla B, Leon H, Moreno-Mendoza N; 2004. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the Tunel technique. *ReprodDomestAnim.* 39(3):141-145.
- Matson PL, Graefling J, Junk SM, Yovich JL, Edirisinghe WR; 1997. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in vitro fertilization programme, *Hum Reprod.* 12:1550–1553.
- Men H, Agca Y, Riley LK, Critser JK; 2006. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology.* 66(8):2008-2016.
- Metcalf AD, Hunter HR, Bloor DJ, Lieberman BA, Picton HM, Leese HJ, et al; 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 11: 255-260.
- Moley KH, Chi MM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Mueckler MM; 1998. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med.* 4(12):1421-1424.
- Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, et al; 2006. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. . 14(2):125- 131.
- Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, et al; 2006. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. . 14(2):125- 131.

- Pomar FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B, et al; 2005. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*. 63:2254-2268.
- Rizos D, Gutierrez-Adana A, Perez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P; 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*. 68:236.
- Robertson I and Nelson RE; 2010. Certification and identification of embryo. In: Stringfellow DA, Givens MD, editors. *Manual of the international embryo transfer society*. Champaign, (IL) USA: IETS. 86-105.
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, Dinnye A, Nagai T, Kikuchi K; 2007. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage *Cryobiology*. 55:115–126.
- Stinshoff H, Wilkening S, Hanstedt A, Bollwein H, Wrenzycki C; 2014. Dimethylsulfoxide and conjugated linoleic acids affect bovine embryo development in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 26:502-510.
- Stroh C, Cassens U, Samraj AK, Sibrowski W, Schulze-Osthoff K, Los M; 2002. The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells. *Fed Am Soc Exp Biol*. 16:1651-1653.
- Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado Tda S, Magalhães LC, Crocomo LF, de Lima Neto JF, et al; 2011. Lipid content and apoptosis of in vitro produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*. 75(7): 1211-1220.
- Wolfe J and Bryant G; 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane solute water systems. *Cryobiology*. 39:103-129.
- Wyllie AH; 1981. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: Bowen ID, Lockshin RA, editors. *Cell death in biology and pathology*. New York: Chapman and Hall. 9-34.
- Xu J, Cheung T, Chan ST, Ho P, Yeung WS; 2001. The incidence of cytoplasmic fragmentation in mouse embryos in vitro is not affected by inhibition of caspase activity. *Fertil Steril*. 75(5):986-991.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS; 1998. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod*; 13:998-1002.

- Zhivotovsky B, Burgess DH, Vanagas DM, Orrenius S; 1997. Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. *Biochem Res Commun.* 230:481-488.
- Zullo G, Albero G, Neglia G, De Canditiis C, Bifulco G, Campanile G, et al; 2016a. L-Ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro produced embryos. *Theriogenology.* 85:688-697.
- Zullo G, De Canditiis C, Pero ME, Albero G, Salzano A, Neglia G, et al; 2016b. Crocetin improves the quality of in vitro-produced bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis. *Theriogenology.* 86(8):1879-1885.





## **Capitolo 4**

Esperimento 2: Influenza dell'inibitore della caspasi,  
Z-VAD-FMK, sulla criotolleranza degli oociti bovini maturati  
in vitro



## 4.1 Materiali e metodi

### 4.1.1 Disegno sperimentale

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare se un trattamento con l'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK, prima, durante e dopo la vitrificazione di oociti bovini maturati in vitro, risultasse efficace nel ridurre l'apoptosi indotta dal processo di crioconservazione, migliorandone la sopravvivenza e la competenza allo sviluppo embrionale post-congelamento. In particolare, gli effetti dell'inibizione dell'apoptosi sulla crioconservazione, sono stati valutati sulla vitalità, sul potenziale di membrana mitocondriale, sulla frammentazione del DNA, sull'attività delle caspasi e sulla competenza allo sviluppo embrionale degli oociti bovini maturati in vitro. A tale fine, gli oociti sono stati recuperati da ovaie in sede di macellazione e maturati in vitro utilizzando una procedura standardizzata, che sarà descritta di seguito.

Dopo 21 ore di maturazione gli oociti sono stati divisi in tre gruppi: un gruppo di oociti non vitrificati (controllo freschi, F-CTR) e due gruppi di oociti vitrificati, rispettivamente non trattati (controllo vitrificati, V-CTR) e trattati con 20  $\mu$ M Z-VAD-FMK (vitrificati trattati, V-ZVAD). Gli oociti del gruppo F-CTR sono stati spostati in un terreno di maturazione standard fresco per 1 ora e processati direttamente senza ricorrere alle procedure di vitrificazione/riscaldamento. Per i gruppi di vitrificazione gli oociti sono stati pretrattati per 1 h nel terreno di maturazione supplementato con 0 (V-CTR) e 20  $\mu$ M (V-ZVAD) dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK, quindi sono stati parzialmente denudati delle cellule del cumulo e sottoposti a vitrificazione/riscaldamento, per poi essere posti nuovamente nel terreno di maturazione per 2 ore per permetterne la ripresa, in presenza/assenza di Z-VAD-FMK. Pertanto, nel gruppo trattato (20  $\mu$ M), Z-VAD-FMK è stato aggiunto prima della vitrificazione, durante la vitrificazione (sia nei terreni di vitrificazione e di riscaldamento) e durante le 2 ore di coltura post-riscaldamento.

Per valutare la competenza allo sviluppo embrionale gli oociti ( $n=111$ , 109 e 110, su un totale di 4 repliche, rispettivamente nei gruppi di controllo freschi, controllo vitrificati e Z-VAD-FMK vitrificati) sono stati fecondati e coltivati in vitro.

Per ciascuna replica, un numero rappresentativo di oociti per ogni gruppo (circa 10-15) è stato utilizzato per valutare la frammentazione del DNA tramite colorazione Tunel ( $n=49$ , 44 e 44 rispettivamente nei gruppi di

controllo freschi, controllo vitrificati e Z-VAD-FMK vitrificati), il potenziale di membrana mitocondriale tramite colorazione JC-1 (n= 58, 56 e 48 rispettivamente nei gruppi di controllo freschi, controllo vitrificati e Z-VAD-FMK vitrificati e l'attività delle caspasi 3 tramite colorazione immunostochimica (n= 43, 46 e 44 rispettivamente nei gruppi di controllo freschi, controllo vitrificati e Z-VAD-FMK vitrificati).

#### *4.1.2 Terreni e reagenti*

Tutti i prodotti chimici sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich/Merck (Milano, Italia). La Dnasi RNA-free e la RNase sono state ottenute da Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, USA). L'inibitore della caspasi Z-VAD-FMK da Promega Corporation (Madison, WI, USA) in polvere è stato disciolto in dimetilsulfossido (DMSO). La concentrazione finale testata è stata 20  $\mu\text{M}$ . È stata preparata una prima soluzione madre di 100 mM di Z-VAD-FMK e successivamente da questo stock è stata effettuata una diluizione 1:5 per preparare la seconda soluzione madre di 20 mM. Questa soluzione madre è stata aliquotata e conservata a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al giorno dell'utilizzo. Per ottenere la concentrazione desiderata (20  $\mu\text{M}$ ) e per ridurre al minimo la quantità di DMSO durante il pretrattamento, la vitrificazione, il riscaldamento e le 2 ore post-riscaldamento, la soluzione madre di Z-VAD-FMK è stata diluita 1:1000 nel terreno di maturazione e nei terreni di vitrificazione/riscaldamento. Il terreno di aspirazione usato è stato il TCM 199 supplementato con 25 mM di HEPES, 2 mM di bicarbonato di sodio, 2 mM di piruvato di sodio, 1 mM di L-Glutammina, 10  $\mu\text{l/ml}$  di amfotericina B (H199) supplementato con 2% di siero bovino adulto (BS) e 95.6SI/ml di eparina. Il terreno di maturazione usato è stato il TCM 199 supplementato con 15% BS, 0.5  $\mu\text{g/ml}$  di FSH, 5  $\mu\text{g/ml}$  di LH, 0.8 Mm di L-Glutammina e 50  $\mu\text{g/ml}$  di gentamicina. Come terreno di fecondazione è stato utilizzato il Tyrode's modified medium (Parrish et al., 1986) senza glucosio e albumina del siero bovino (BSA), supplementato con 5,3 SI/ml di eparina, 30  $\mu\text{M}$  di penicillamina, 15  $\mu\text{M}$  di ipotaurina, 1  $\mu\text{M}$  di epinefrina e 1% di BS. Il terreno Sperm-Talp è stato usato per la separazione del seme. Il terreno di coltura consisteva nel SOF, con 30  $\mu\text{l/ml}$  di aminoacidi essenziali, 10  $\mu\text{l/ml}$  di aminoacidi non essenziali e 5% di BS.

Il terreno utilizzato durante il pre-trattamento è stato TCM 199 supplementato con 15% BS, mentre il terreno base per la vitrificazione e per le soluzioni di riscaldamento è stato preparato partendo dal H199 con il 20% di BS. Il terreno di equilibrio (VS1) consisteva nel 7,5% di DMSO e 7,5%

di EG nel terreno base; la soluzione di vitrificazione (VS2) consisteva nel 15% di DMSO e 15% di EG con 0,5 M di saccarosio nel terreno base. Le soluzioni di riscaldamento utilizzate sono state 1 M, 0,5 M e 0,25 M di saccarosio nel terreno base.

#### *4.1.3 Raccolta oociti e maturazione in vitro (IVM)*

Gli oociti provenienti dalla macellazione sono stati maturati in vitro secondo la nostra procedura standard (Rubessa et al., 2011). In breve, le ovaie bovine sono state recuperate da un macello locale e trasportate al laboratorio in soluzione fisiologica ad una temperatura di 30-35 °C. I complessi cumulo-oocita (COC) sono stati aspirati da follicoli di 2-8 mm di diametro e solo quelli con un citoplasma uniforme e un multistrato di cellule del cumulo sono stati selezionati, sono stati lavati due volte nel terreno di aspirazione e una volta nel terreno di maturazione. Gruppi di 25 COC sono stati maturati in 400 µl di IVM, coperti con olio minerale, in una piastra a quattro pozzetti (Nunc<sup>TM</sup>, Roskilde, Danimarca), per 21 ore a 39°C con il 5% di CO<sub>2</sub>. Successivamente spostati per 1 ora a 39 °C con il 5% di CO<sub>2</sub> in terreno di maturazione supplementato o meno con 20 µM di Z-VAD-FMK.

#### *4.1.4 Vittrificazione e riscaldamento*

Dopo l'IVM, i COC sono stati lavati e le cellule del cumulo sono state rimosse parzialmente e meccanicamente tramite vortex in H199 supplementato con il 5% di BS. Gli oociti parzialmente denudati sono stati vittrificati con il metodo Cryotop precedentemente descritto (Escribano et al., 2016).

Gli oociti sono stati trasferiti in 3 gocce da 75 µl di VS1 per una durata totale di 10/15 minuti, che dipendeva dal tempo necessario al ripristino dell'espansione del citoplasma dopo l'iniziale coartazione, dopodiché sono stati trasferiti in 4 gocce da 50 µl di VS2 per una durata complessiva di 45/60 secondi. Gruppi di 4-6 oociti sono stati caricati con un capillare di vetro sull'estremità di ciascun Cryotop nel minimo volume possibile. Dopo il caricamento, quasi tutta la soluzione è stata rimossa (volume finale di <0,1 µl circa) e il Cryotop è stato rapidamente immerso in azoto liquido, entro 25 secondi. Per il riscaldamento, la procedura consisteva in 4 passaggi utilizzando concentrazioni decrescenti di saccarosio. L'estremità del Cryotop è stata posta direttamente in 3 ml di soluzione 1 M di saccarosio per 1 minuto, gli oociti recuperati sono stati successivamente trasferiti in una

goccia di 200  $\mu$ l di soluzione 0.5 M di saccarosio per 3 minuti, quindi in una goccia di 0.25 M di saccarosio per 5 minuti ed infine in un terreno di lavaggio H199 + 10% di FCS per 5 minuti. Quindi gli oociti dei due gruppi di vitrificazione sono stati trasferiti per 2 ore in IVM in assenza (controllo vitrificati) e presenza di 20  $\mu$ M Z-VAD-FMK (Z-VAD-FMK vitrificati) a 39°C con il 5% di CO<sub>2</sub>, per permetterne la ripresa.

#### *4.1.5 Fecondazione e coltura in vitro*

Dopo la fase di maturazione gli oociti sono stati lavati nel terreno di fecondazione e trasferiti, circa 25-30 per pozzetto, in 300  $\mu$ l di terreno di fecondazione, coperto con olio minerale in una piastra a 4 pozzetti. Il seme congelato di un toro precedentemente testato per la fecondazione in vitro è stato scongelato e separato sui gradienti discontinui di Percoll (45% e 80%). Il pellet è stato risospeso con 2 ml di terreno Sperm-Talp e centrifugato due volte, a 160 e 108 g per 10 minuti. Successivamente il pellet è stato diluito con terreno IVF e aggiunto nei pozzetti di fecondazione alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  spermatozoi/ml. I gameti sono stati co-incubati per 20 ore a 39°C, con una concentrazione di CO<sub>2</sub> del 5%; quindi i presunti zigoti sono stati vortexati per 2 minuti per rimuovere le cellule del cumulo in H199 supplementato con il 5% di BS, sono stati lavati due volte nello stesso terreno e messi in coltura (30-35 per pozzetto) in 400  $\mu$ l di terreno SOF. Le piastre sono state incubate ad una temperatura di 39°C in un'atmosfera modificata con il 5% di CO<sub>2</sub>, 7% di O<sub>2</sub> e 88% di N<sub>2</sub> all'interno di una camera modulare a tenuta umidificata. La percentuale di oociti sopravvissuti è stata valutata al momento della fecondazione in vitro (giorno 0), mentre il cleavage e la resa in blastocisti sono state valutate al giorno 7.

#### *4.1.6 Valutazione della frammentazione del DNA, mediante Colorazione Tunel/Hoechst 33342*

Gli oociti dei tre gruppi sperimentali sono stati sottoposti a colorazione Tunel, precedentemente descritta (Yuan et al 2005) con delle piccole modifiche, per valutare la frammentazione del DNA. Dopo 3 lavaggi in una soluzione di PBS con l'1 % di polivinilpirrolidone (PBS-PVP) gli oociti sono stati fissati in paraformaldeide al 4 % per 45 minuti a temperatura ambiente (RT). Quindi i campioni sono stati lavati in PBS-PVP ed incubati in una soluzione, preparata poco prima dell'utilizzo, di 0,5% Triton X-100 con 0,1% di sodio citrato (v/v) in PBS per 45 minuti a RT. Quindi alcuni

campioni, da utilizzare come controlli positivi e negativi per il saggio Tunel, sono stati precedentemente incubati in 50  $\mu$ l di RQ1-RNA free DNase (50 U/ml) a 37°C al buio per 15 minuti, mentre i campioni della prova sono stati lasciati in PBS-PVP. Al termine dell'incubazione la colorazione Tunel è stata eseguita utilizzando il kit In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein secondo le istruzioni. Brevemente, gli oociti sono stati incubati nella miscela di reazione della Tunel con una diluizione della soluzione enzimatica di 1:10 (terminal deoxy-nucleotidyl transferase) nella label solution (nucleotide mixture) in camera umida per 1 ora a 37°C al buio. Dopo il lavaggio in PBS-PVP, i controlli positivi sono stati incubati in gocce della miscela Tunel contenente la fluoresceina isotiocianato-coniugata dUTP e l'enzima terminal deoxynucleotidyltransferase per 1 ora a 37°C al buio. I controlli negativi, invece, sono stati incubati in gocce della label solution fluorescente in assenza dell'enzima.

A questo punto sia i controlli che gli oociti dei gruppi sperimentali sono stati lavati in PBS-PVP per 3-4 volte ed incubati a 37 °C per 15 minuti con 1  $\mu$ g/ml Hoechst 33342, lavati nuovamente in PBS-PVP e montati su vetrino per microscopio in una goccia di glicerolo, coperto con un vetrino coprioggetto. Successivamente, ogni oocita è stato analizzato usando un microscopio a fluorescenza (Eclipse E-600; Nikon, Japan) sotto luce ultravioletta con filtro di eccitazione DAPI (460 nm per la fluorescenza blu), e filtri FITC (520 nm). Le immagini digitali di ciascun oocita sono state acquisite utilizzando il software NIS-Elements-F e una fotocamera digitale a colori ad alta risoluzione (Digital Sight DS-Fi 1C; Nikon, Japan). La presenza del nucleo nella cellula è visualizzata con il colore blue, mentre i nuclei frammentati si colorano in verde (Figura 4.1).

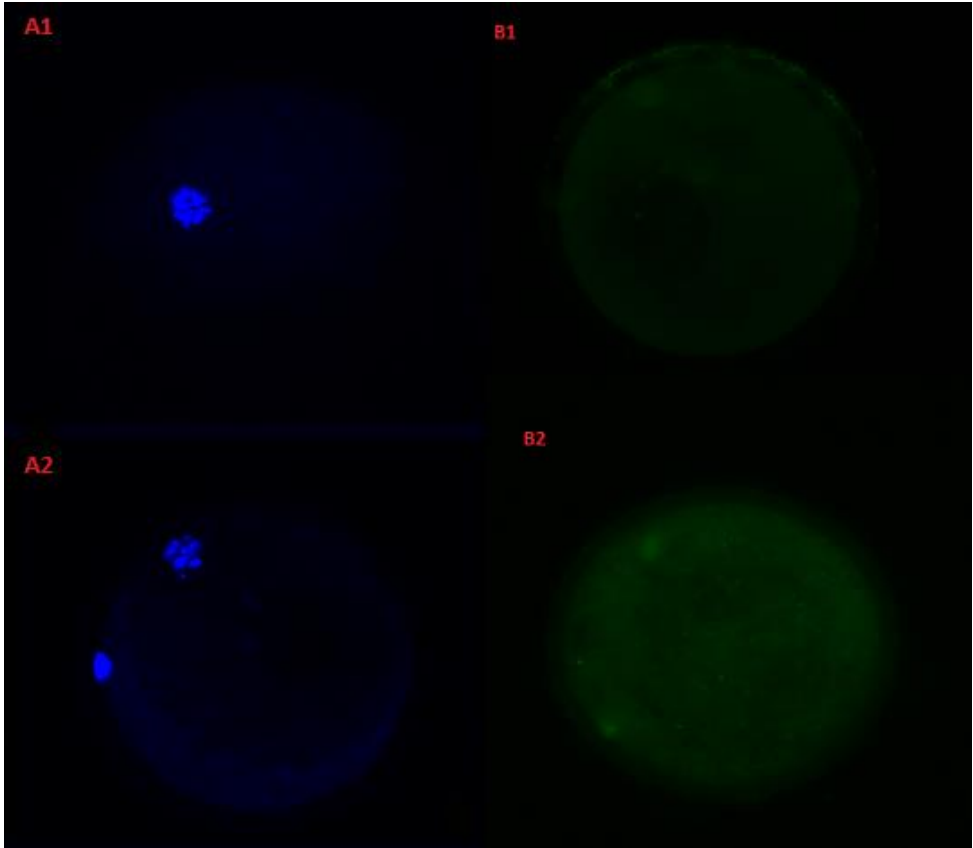


Fig. 4.1 Immagini di oociti bovini maturi vitrificati in assenza (controllo; A1-B1) e in presenza dell'inibitore delle caspasi 20  $\mu$ M Z-VAD-FMK (A2-B2). Oociti colorati con Hoechst 33342(A1-A2); oociti colorati con la Tunel (B1-B2) e con DNA frammentato (B2).

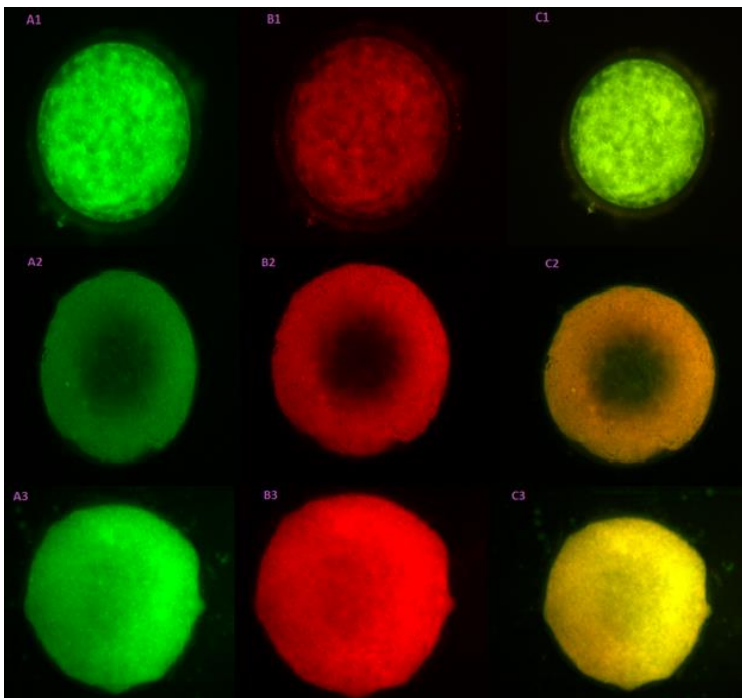
#### 4.1.7 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\Psi_m$

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato valutato tramite la colorazione JC-1 (5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidacarbocyanine iodide) (Thermofisher Scientific, T3168), già descritta in precedenza da Jones et al 2004.

Al termine della maturazione per gli oociti freschi ed al termine delle 2 ore di coltura post-riscaldamento per i vitrificati, gli oociti sono stati lavati in 3-4 gocce di TCM-hepes e, quindi, esposti a 1mg/ml di JC-1 per 30 minuti a 37°C al buio. Dopo l'incubazione sono stati lavati 3-4 volte in TCM-Hepes



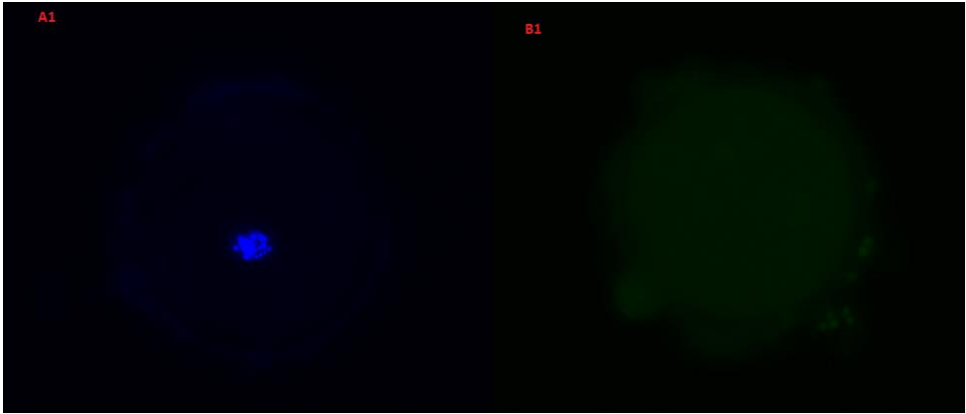
e montati su un vetrino in una goccia di glicerolo, coperto da coprioggetto. La colorazione è stata visualizzata utilizzando un microscopio fluorescente (Eclipse E-1000; Nikon, Japan) sotto la luce ultravioletta con filtri di eccitazione TRITC (532 nm per fluorescenza rossa) e FITC (520 nm per fluorescenza verde) acquisiti con una fotocamera Digital Sight DS-Fi 1C (Nikon, Japan), utilizzando un obiettivo 20x. Le immagini acquisite (Figura 4.2) sono state analizzate utilizzando Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MA). La fluorescenza di JC-1 ha due picchi di emissione, laddove la fluorescenza rossa (JC-1 dimeri) indica alta polarizzazione mitocondriale (alto potenziale di membrana), mentre quella verde (JC-1 monomeri) indica bassa polarizzazione mitocondriale (basso potenziale di membrana). L'attività mitocondriale può essere valutata tramite il rapporto tra la fluorescenza rossa e quella verde.



*Fig. 4.2 Immagini di oociti bovini maturi freschi (A1-B1-C1) vitrificati in assenza (controllo; A2-B2-C2) e in presenza dell'inibitore delle caspasi 20  $\mu$ M Z-VAD-FMK (A3-B3-C3). Le immagini contraddistinte dalle lettere A1-A2-A3 rappresentano oociti con basso potenziale di membrana (JC-1 verde), quelle con le lettere B1-B2-B3 rappresentano oociti con alto potenziale di membrana (JC-1 rosso), le immagini invece con le lettere C1-C2-C3 sono state sovrapposte.*

#### 4.1.8 *Immunoistochimica per caspasi 3*

Gli oociti sono stati fissati in una soluzione di paraformaldeide 4% (PFA) in PBS a temperatura ambiente per 45 minuti, lavati e stoccati in PBS-PVP (1%) a 4°C fino al momento dell'utilizzo. Il giorno della colorazione immunoistochimica, gli oociti fissati sono stati lavati in PBS-PVP, permeabilizzati in un blocking buffer composto da PBS con il 10% di siero di capra, 0,1% BSA e 0,5% Triton X-100 per 1 ora a RT, e successivamente incubati con un anticorpo primario per caspase 3 (D-175, Rabbit mAb 9664S, Cell Signaling Technology) diluito nel blocking buffer (1:50), per tutta la notte. Gli embrioni sono stati lavati in PBS-PVP e incubati con un anticorpo secondario FITC (F-0382, anti-rabbitIgG-FITC, Sigma) diluito in blocking buffer (1:1000), per 1 ora a temperatura ambiente. Infine, gli oociti sono stati lavati in PBS-PVP, colorati con 10 µg /ml di bis-benzimide (Hoechst 33342) per 15 minuti a RT al buio, lavati nuovamente in PBS-PVP, montati su un vetrino per microscopio in una goccia di glicerolo e coperti con un vetrino coprioggetto. Il controllo negativo della colorazione immunoistochimica è stato effettuato tramite l'omissione dell'anticorpo primario, mentre per il controllo positivo è stata fatta un'incubazione in 50 µl di RQ1-RNA free DNase (50 U/ml) a 37°C al buio per 15 minuti subito dopo la fissazione in paraformaldeide. La colorazione è stata visualizzata utilizzando un microscopio fluorescente (Eclipse E-1000; Nikon, Japan) sotto la luce ultravioletta con filtri di eccitazione DAPI (460 nm per fluorescenza blu) e FITC (520 nm) acquisiti con una fotocamera Digital Sight DS-Fi 1C (Nikon, Japan), utilizzando un obiettivo 20x. Le immagini acquisite (Figura 4.3) sono state analizzate utilizzando Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MA). L'area totale dell'oocita è stata delineata manualmente con lo strumento di selezione poligono e sono state analizzate le immagini acquisite dal canale FITC. Il background di fondo e i legami aspecifici sono stati rimossi calcolando la media dei pixel per i controlli delle IgG e sottraendo questi valori dall'intensità media individuale dei pixel degli oociti. Inoltre, le aree che non corrispondevano all'oocita sono state rimosse, e, laddove avveniva, le regioni dell'oocita che presentavano una rottura della zona pellucida.



*Fig. 4.3 Immagini di oociti bovini maturi vitrificati. Oociti colorati con Hoechst 33342(A1); oociti colorati con anticorpo secondario per caspase 3 FITC (B1).*

### 4.2 Analisi statistica

Le differenze tra i gruppi nelle percentuali di sopravvivenza, cleavage e blastocisti sono state analizzate mediante ANOVA e il test di Tukey è stato usato per il confronto tra i gruppi. La stessa analisi è stata effettuata per confrontare le percentuali di frammentazione del DNA, il potenziale di membrana mitocondriale e l'attività caspatica. Sono stati considerati come significativi livelli del 5% ( $P < 0,05$ ).

### 4.3 Risultati

Come si evince dalla Tabella 4.1, la vitrificazione degli oociti ha determinato un decremento significativo della sopravvivenza ( $P < 0,01$ ), così come delle percentuali di cleavage ( $P < 0,05$ ) e di blastocisti ( $P < 0,01$ ). Non sono, invece, emerse differenze significative tra i due gruppi di vitrificazione; infatti, gli oociti trattati con l'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK hanno dati percentuali di sopravvivenza, cleavage e blastocisti comparabili a quelle degli oociti non trattati (V-CTR).

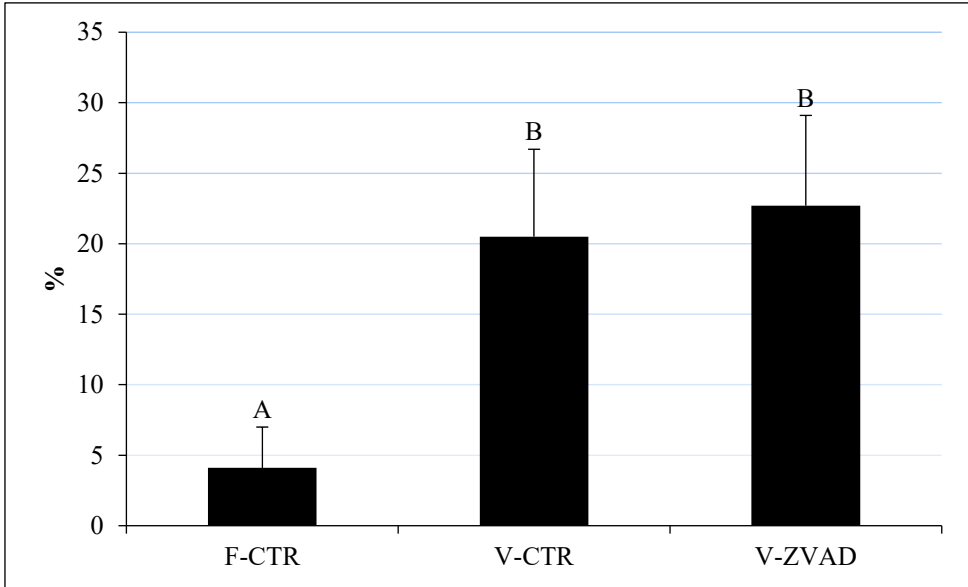
Tab. 4.1 Tassi di sopravvivenza, di cleavage e rese in blastocisti di oociti freschi (F-CTR) e vitrificati in assenza (V-CTR) e presenza di  $20 \mu\text{M}$  ZVAD-FMK (V-ZVAD), su un totale di 4 repliche.

Gruppi	n	Sopravvivenza	Cleavage	Blastocisti/COC	Blastocisti/divisi
		(%)	(%)	(%)	(%)
		Media $\pm$ SE	Media $\pm$ SE	Media $\pm$ SE	Media $\pm$ SE
F-CTR	111	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>A</sup>	73.1 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>	40.1 $\pm$ 8.5 <sup>A</sup>	55.1 $\pm$ 10.8 <sup>A</sup>
V-CTR	109	87.1 $\pm$ 1.4 <sup>B</sup>	42.4 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	6.7 $\pm$ 2.0 <sup>B</sup>	15.3 $\pm$ 4.4 <sup>B</sup>
V-ZVAD	110	88.0 $\pm$ 0.8 <sup>B</sup>	47.7 $\pm$ 9.9 <sup>b</sup>	6.2 $\pm$ 2.1 <sup>B</sup>	12.7 $\pm$ 5.6 <sup>B</sup>

<sup>A,B</sup> I valori all'interno di una colonna con apice differente indicano differenze significative a  $P < 0,01$

<sup>a,b</sup> I valori all'interno di una colonna con apice differente indicano differenze significative a  $P < 0,05$

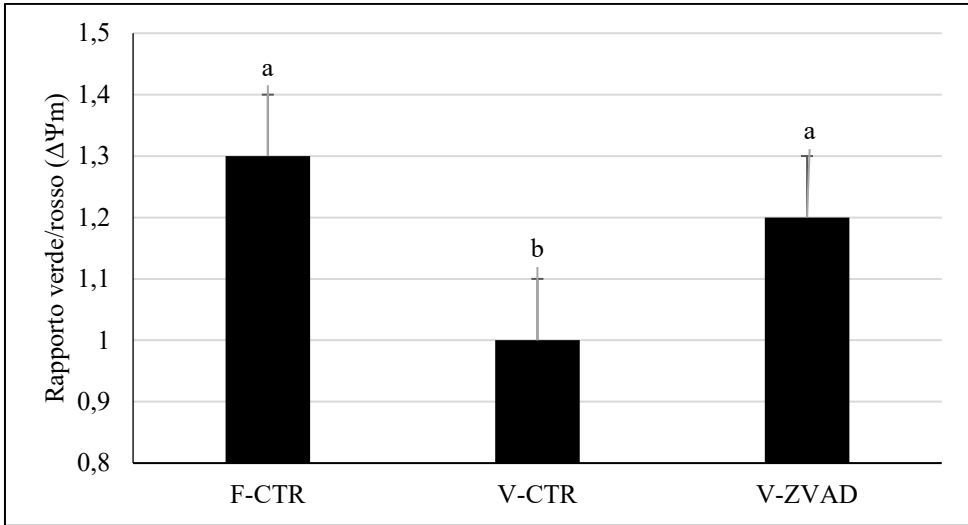
La vitrificazione ha determinato altresì un aumento significativo dell'apoptosi, come indicato dalle percentuali più elevate ( $P < 0,01$ ) di oociti che mostravano frammentazione del DNA in entrambi i gruppi di vitrificazione rispetto al gruppo F-CTR ( $19.3 \pm 7.2$  vs  $4.4 \pm 3.0$ , rispettivamente; Figura 4.4). Invece, non sono state registrate differenze significative tra i due gruppi di vitrificazione, V-CTR e V-ZVAD (Figura 4.4).



<sup>A,B</sup> Barre contrassegnate da lettere diverse sono significativamente differenti;  $P < 0,01$

*Fig. 4.4 Percentuali di oociti con DNA frammentato (media  $\pm$  SE) in oociti freschi (F-CTR) e vitrificati in assenza (V-CTR) e presenza di 20  $\mu$ M ZVAD-FMK*

La Figura 4.5 mostra il potenziale di membrana mitocondriale che è diminuito significativamente ( $P < 0,05$ ) nel gruppo di oociti vitrificati in assenza di trattamento (V-CTR;  $1.0 \pm 0.1$ ) per ritornare ai livelli del gruppo F-CTR ( $1.3 \pm 0.1$ ) quando gli oociti erano esposti all'inibitore delle caspasi (V-ZVAD;  $1.2 \pm 0.1$ ).



<sup>a,b</sup> Barre contrassegnate da lettere diverse sono significativamente differenti;  $P < 0,05$

<sup>A,B</sup> Barre contrassegnate da lettere diverse sono significativamente differenti;  $P < 0,01$

Fig. 4.5 Potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) indicato dal rapporto di fluorescenza verde/rosso (media  $\pm$  SE), di oociti freschi (F-CTR) e vitrificati in assenza (V-CTR) e presenza di 20  $\mu$ M ZVAD-FMK

Come mostrato nella Tabella 4.2, l'attività della caspasi 3 non è stata influenzata né dalla vitrificazione né dal trattamento con ZVAD-FMK.

Tab. 4.2 Attività della caspasi 3 attivata in oociti freschi (F-CTR) e in oociti vitrificati in assenza (V-CTR) e presenza dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK (V-ZVAD)

Gruppo	n	Attività Caspasi 3
F-CTR	43	0.88 $\pm$ 0.07
V-CTR	46	0.72 $\pm$ 0.07
V-ZVAD	44	0.85 $\pm$ 0.08

#### 4.4 Discussione

Lo scopo di questo esperimento era di verificare l'efficacia del trattamento di oociti bovini maturati in vitro con un inibitore delle caspasi nel prevenire l'apoptosi indotta dalla crioconservazione e migliorare la criotolleranza. I risultati di questo esperimento hanno confermato che la vitrificazione determina danni a livello del DNA e del potenziale di membrana mitocondriale che si traducono in una ridotta sopravvivenza e competenza allo sviluppo degli oociti bovini, attestata dalla diminuzione significativa dei tassi di cleavage e blastocisti. L'ipotesi del lavoro non è però stata confermata, in quanto il trattamento degli oociti con l'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK prima, durante e dopo la vitrificazione, non è risultato efficace nel prevenire l'apoptosi indotta dalla crioconservazione stessa né tantomeno nel migliorare la resistenza degli oociti al processo di crioconservazione.

È noto che la crioconservazione dei gameti femminili è allo stato attuale ancora una sfida aperta e che l'insuccesso della tecnica è ascrivibile a peculiarità della cellula uovo, che la rendono particolarmente vulnerabile agli insulti da freddo. Nonostante un'ingente mole di studi effettuati nelle varie specie domestiche, lo sviluppo di numerosi protocolli innovativi di vitrificazione, l'utilizzo di miscele di crioprotettori meno tossiche, un denominatore comune è rappresentato dalla perdita della competenza oocitaria allo sviluppo (Vajta e Kuwayama, 2006; Ledda et al., 2007). Diversi lavori hanno dimostrato che la vitrificazione è vantaggiosa rispetto al congelamento lento soprattutto per cellule particolarmente sensibili come gli oociti in quanto by-passa la formazione dei cristalli di ghiaccio, attenuando i danni meccanici alla cellula (Zhou e Li, 2009). Tuttavia anche la tecnica di vitrificazione ha dei punti critici, quali la tossicità dei crioprotettori, utilizzati ad elevate concentrazioni, nonché lo shock termico ed osmotico, responsabili di alterazioni a livello del fuso meiotico, dei microtubuli e della distribuzione dei granuli corticali, della zona pellucida e dell'attivazione spontanea (Wu et al., 2006; Gupta et al., 2007; Somfai et al. 2007; Diez et al., 2005). Gli oociti vitrificati e riscaldati vanno incontro a questi cambiamenti che comportano una perdita della competenza e successiva degenerazione (Men et al. 2003; Gupta et al. 2010). È noto che la degenerazione delle cellule avviene mediante due meccanismi: l'apoptosi e la necrosi. È stato ampiamente dimostrato che la crioconservazione determina la degenerazione degli oociti mediante attivazione della cascata apoptotica (Men et al., 2003; Gualtieri et al., 2009). Sebbene l'apoptosi,



ovvero la morte cellulare programmata, sia un meccanismo endogeno di degenerazione cellulare necessario per un corretto sviluppo e omeostasi tissutale (Wyllie et al 1980), un'aberrante attivazione del pathway stesso si verifica in risposta a diversi stressors, quali insulti termici, tossici ecc. Infatti, diverse evidenze indicano che la perdita della competenza degli oociti dopo crioconservazione sia imputabile ad un'attivazione anomala dell'apoptosi (Niu et al., 2016). Il processo apoptotico inizia con l'attivazione di un gruppo di proteasi, appartenenti alla famiglia delle caspasi, normalmente presenti nelle cellule come proenzimi inattivi. Tali proteine intervengono nella divisione del DNA, nei danni al citoscheletro e nella produzione dei corpi apoptotici, giocando un ruolo chiave come iniziatori ed esecutori della cascata apoptotica. Queste osservazioni hanno rappresentato il punto di partenza del lavoro, in cui è stato ipotizzato che la prevenzione dell'attivazione anomala dell'apoptosi, mediante l'inibitore delle caspasi ZVAD-FMK, possa tradursi in un miglioramento della criotolleranza degli oociti. Questo inibitore è in grado di penetrare la membrana e di legarsi irreversibilmente al sito catalitico delle caspasi per inibire l'apoptosi. L' inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK è stato utilizzato con successo nel prevenire l'apoptosi ed incrementare la sopravvivenza al congelamento di diversi tipi cellulari (Men et al., 2006; Bissoyi e Pramanik, 2014), inclusi oociti porcini (Niu et al.2016) ed embrioni bovini (Esperimento 1).

Per valutare l'efficienza di Z-VAD-FMK sulla criotolleranza degli oociti bovini maturati in vitro sono state valutate: l'attività caspasi con riferimento alla caspasi 3, la frammentazione del DNA, il potenziale di membrana mitocondriale e la competenza allo sviluppo dopo fecondazione in vitro.

In disaccordo con studi precedenti, in questo lavoro non è stata evidenziata un'attivazione delle caspasi a seguito della crioconservazione. Stroh et al. (2002) avevano dimostrato, infatti, che la crioconservazione di diversi tipi cellulari è associata ad un'attivazione delle caspasi, con particolare riferimento alla caspasi 3, che giocano un ruolo chiave nell'induzione della cascata apoptotica. Inoltre, un'aumentata attività delle caspasi in risposta alla vitrificazione è stata descritta in oociti della specie suina (Vallorani et al. 2012), e tale attività è risultata correlata negativamente alla sopravvivenza degli stessi (Giaretta et al 2013). La mancata attivazione di caspasi 3 dopo la vitrificazione osservata nel nostro studio è, peraltro, in contrasto con uno studio condotto in precedenza su oociti bovini (Men et al., 2003). Tale apparente discrepanza è giustificabile sia dall'utilizzo, nello

studio precedente, di una metodica diversa per il rilevamento delle caspasi, sia dal fatto che erano stati analizzati solo gli oociti degenerati a seguito della crioconservazione, mancando, pertanto, un controllo di oociti non vitrificati. Il confronto diretto di oociti vitrificati e non effettuato nel nostro esperimento indica che la crioconservazione di oociti bovini maturati in vitro non comporta alcuna attivazione di caspasi 3, la caspasi maggiormente implicata nel danno da freddo. Tuttavia, la mancata attivazione delle caspasi non si accorda con l'incremento significativo della frammentazione del DNA, rilevato negli oociti dopo crioconservazione. La frammentazione del DNA, valutata mediante tecnica Tunel, è un evento terminale cui convergono diversi pathways di morte cellulare, quali l'apoptosi e la necrosi. Il decremento del potenziale di membrana mitocondriale rilevato negli oociti vitrificati in assenza dell'inibitore si accorda bene, invece, con l'incremento della frammentazione del DNA. Il potenziale di membrana mitocondriale è stato valutato con il JC-1, colorante fluorescente che si accumula nei mitocondri, che emette fluorescenza verde e rossa in funzione del suo stato, che dipende proprio dal  $\Delta\Psi_m$ : con  $\Delta\Psi_m$  basso rimane allo stato di monomero emettendo fluorescenza verde al filtro FITC, mentre nel caso di alto  $\Delta\Psi_m$  dimerizza emettendo fluorescenza rossa al filtro TRITC. In numerosi modelli sperimentali la frammentazione del DNA è preceduta da severe perturbazioni della funzione mitocondriale rilevate appunto come decremento del potenziale di membrana. Tale decremento è associato alla produzione di ROS che contribuiscono alla morte cellulare (Kroemer, 1997). Quindi i risultati dell'esperimento hanno dimostrato che la crioconservazione si traduce in una serie di danni, quali l'alterazione della funzione mitocondriale e la frammentazione del DNA, responsabili della perdita della competenza, attestata dalla riduzione significativa dei tassi di cleavage e rese embrionali dopo IVF, che appaiono indipendenti dall'attivazione caspasi. Questi risultati metterebbero, dunque, in discussione l'assunto che la degenerazione degli oociti causata dalla crioconservazione avvenga mediante il meccanismo dell'apoptosi caspasi-mediata.

È stato evidenziato che gli oociti fetali possono andare incontro a forme di morte cellulare alternative e/o parallele all'apoptosi che convergono nella frammentazione del DNA, rilevata mediante la Tunel (De Felici et al., 2008). In particolare, l'utilizzo di inibitori delle calpaine e di mTOR ha consentito di rilevare l'attivazione del pathway dell'autofagia indipendente dalle caspasi nel determinismo della morte cellulare degli oociti. Tale meccanismo di attivazione dell'autofagia è stato peraltro descritto in oociti

di topo in risposta alla vitrificazione/riscaldamento (Bang et al., 2014). D'altra parte la degenerazione cellulare potrebbe anche essere causata dalle alterazioni a carico del citoscheletro che, nell'oozita maturo, si estrinsecano, tra l'altro, con la depolimerizzazione dei microtubuli componenti il fuso meiotico e disassemblaggio di tale struttura, con conseguente alterazione della configurazione della cromatina che può esitare in aneuploidie e frammentazione del DNA (Chen et al., 2003; Tharasanit et al., 2006).

In contrasto con quanto riportato da Niu et al., (2016) nella specie suina, il trattamento degli oociti bovini con Z-VAD-FMK alla concentrazione di 20  $\mu$ M non è risultato efficace nell'inibire l'attività della caspasi 3. La mancata efficacia dell'inibitore nel nostro studio potrebbe essere ascrivibile a differenze di specie così come di tempi di esposizione. In realtà nel nostro studio l'esposizione si è protratta più a lungo in quanto gli oociti risultavano esposti per 1 ora prima, durante la vitrificazione/ riscaldamento e per 2 ore di coltura post-riscaldamento, mentre nello studio sugli oociti suini il trattamento era limitato alla fase di post-riscaldamento. Ci si sarebbe piuttosto atteso un'amplificazione dell'effetto ma così non è stato. È ipotizzabile che la concentrazione risultata efficace sugli oociti di suino (Niu et al. 2016) e sugli embrioni bovini (Esperimento 1) non sia quella ottimale per gli oociti di bovino. Un effetto dose dipendente di Z-VAD-FMK era stato descritto in un lavoro su cellule ematopoietiche, in cui era stata dimostrata un'influenza positiva sulla sopravvivenza al congelamento a basse concentrazioni, con una perdita di efficacia a concentrazioni superiori. Il minor effetto protettivo riscontrato a concentrazioni più elevate o dopo esposizioni di maggiore durata avevano lasciato ipotizzare una potenziale tossicità dell'inibitore caspatico e un ruolo per Z-VAD-FMK non relativo all'inibizione della morte cellulare programmata.

Il trattamento con l'inibitore non è stato efficace nel prevenire l'apoptosi indotta dal freddo, tant'è vero che la frammentazione del DNA è stata sovrapponibile nei due gruppi di vitrificazione. Tuttavia un effetto positivo del trattamento è stato osservato sulla funzione mitocondriale; infatti, negli oociti vitrificati che erano stati esposti a ZVAD-FMK, il potenziale di membrana mitocondriale è risalito per raggiungere valori comparabili a quelli degli oociti non vitrificati. Questo dato è di difficile interpretazione; infatti gli oociti vitrificati con ZVAD-FMK, pur avendo una funzione mitocondriale simile a quella degli oociti non vitrificati, fondamentale ai fini della vitalità e competenza degli stessi, mostravano un'elevata frammentazione del DNA. Infine il trattamento è risultato influente sulla competenza degli oociti allo sviluppo: tutti i parametri analizzati, quali i

tassi di sopravvivenza post-riscaldamento, di cleavage e di blastocisti sono stati ridotti, infatti, in egual misura nei due gruppi di vitrificazione.

In conclusione, la strategia di prevenire l'apoptosi indotta da crioconservazione con l'inibitore caspatico Z-VAD-FMK non è perseguibile per migliorare la criotolleranza di oociti bovini, sia perché di fatto non è stato rilevato un aumento delle caspasi dopo crioconservazione, sia perché l'inibitore non ha minimamente influenzato la suddetta attività caspatica. È opportuno, però, sottolineare che in questo esperimento è stata usata solo la concentrazione di 20  $\mu\text{M}$ , risultata efficace per oociti di altre specie e per gli embrioni bovini nel primo esperimento. Ne consegue la necessità di approfondire lo studio testando diverse concentrazioni dell'inibitore e tempi di esposizione prima di escluderne un potenziale utilizzo come "crioprotettore". Si ritiene inoltre fondamentale approfondire lo studio sull'apoptosi indotta da crioconservazione negli oociti di questa specie per verificare l'eventuale maggiore coinvolgimento di altre proteine nell'induzione della cascata apoptotica o delucidare meglio il meccanismo di morte cellulare cui vanno incontro gli oociti bovini dopo vitrificazione.

- Bang S, Shin H, Song H, Suh CS, Lim HJ;2014. Autophagic activation in vitrified-warmed mouse oocytes. *Reproduction*;148:11-9.
- Bissoyi A e Pramanik K; 2014. *Biopreserv biobanking*.12,246-244.
- Chen SU, Lien YR, Chao HN, Ho YS, Yang TY, Lee TY; 2003. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing—a review article. *Mol Cell Endocr*. 202:101-107.
- De Felici M, Lobascio AM, Klinger FG; 2008. Cell death in fetal oocytes: many players for multiple pathways. *Autophagy*; 4:2-240-242.
- Diez C, Duque P, Gomez E, Hidalgo CO, Tamargo C, Rodriguez A, et al; 2005. Bovine oocyte vitrification before and after meiotic arrest: effect on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology*. 64:317–33.
- Escribano Ortiz N, Smits K, Piepers S, Van den Abbeel E, Woelders H, Van Soom A; 2016. Role of cumulus cells during vitrification and fertilization of mature bovine oocytes: Effects on survival, fertilization, and blastocyst development. *Theriogenology*. 86(2):635-41.
- Giarretta E, Spinaci M, Bucci D, Tamanini C, Galeati G;2013. *Oxid Med cell Longev* .920257.
- Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R; 2009. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status *Fertil. Steril.*, 91 (4): 1023-1034.
- Gupta MK, Sang JU and Hoon TL; 2010. Effect of vitrification and betamercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 93, 8.
- Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT; 2007. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology*, 67 (2). 238-248.
- Jones A, Van Blerkom J, Davis P, and Toledo A; 2004. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. *Human Reproduction* 19,8:1861–1866.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA; 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18:44–51.
- Ledda S, Bogliolo L, Succu S, Ariu F, Bebbere D, Leoni GG, et al; 2007. Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival. *Reprod Fertil Dev*. 19:13–22.

- Men H, Agca Y, Riley LK, Critser JK; 2006. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology*. 66(8):2008-2016.
- Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ; 2003. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology*. 47: 73-81.
- Niu Y, Jianjun D, Chen Y, Wu C, Zhang S, Zhang D; 2016. Positive effect of apoptotic inhibitor Z-VAD-FMK on vitrified-thawed porcine MII stage oocytes. *Cryoletters*; 37(3):188–195.
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, Dinnye A, Nagai T, Kikuchi K; 2007. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage *Cryobiology*. 55:115–126.
- Stroh C, Cassens U, Samraj AK, Sibrowski W, Schulze-Osthoff K, Los M; 2002. The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells. *Fed Am SocExpBiol*. 16:1651-1653.
- Tharasanit T, Yamaji YF, Kleinhans FW, Magosaburo K, Colenbrander B, Stout TAE; 2006. Effect of maturation stage at cryopreservation on post-thaw cytoskeleton quality and fertilizability of equine oocytes. *Mol Reprod Dev*. 73:627–637.
- Vajta G and Kuwayama M; 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 65:236–244.
- Vallorani C, Spinacia M, Buccia D, Porcub E, Tamaninia C, Galeatia G; 2012. Pig oocyte vitrification by Cryotop method and the activation of the apoptotic cascade.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR; 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 68:251–306.
- Yuana YQ, Van Sooma A, Leroya JLMR, Dewulfa J, Van Zeverenb A, de Kruifa A; 2005. Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* 63:2147–2163.
- Zhou GB and Li N; 2009 Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances *Mol. Hum. Reprod.*, 15 (5). 279-285.

## **Capitolo 5**

Esperimento 3: influenza dell'inibitore della caspasi, Z-VAD-FMK, sulla criotolleranza degli spermatozoi bovini





## 5.1 Materiali e metodi

### 5.1.1 Disegno sperimentale

Lo scopo di questo esperimento è stato quello di valutare l'effetto anti-apoptotico dello Z-VAD-FMK, un inibitore delle caspasi, prima, durante e dopo il congelamento di spermatozoi bovini. Dodici tori bovini (*Bos Taurus*) di razza Frisona Italiana, di età compresa tra i 4 e i 6 anni, allevati presso il Centro Tori Chiacchierini (Civitella D'Arna, Italia) sono stati selezionati per lo studio. L'esperimento è stato realizzato utilizzando 6 pool di seme con spermatozoi di quattro diversi tori (4 eiaculati/toro). Ogni pool è stato diviso in 4 aliquote: un'aliquota è stata utilizzata per le valutazioni sul seme fresco, mentre le altre tre aliquote sono state diluite a 37 °C con un extender privo di proteine animali, BioXcell (IMV-technologies, Francia), contenente 0 (controllo, i.e. gruppo pre-0), 20 µM (gruppo pre-20) e 100 µM Z-VAD-FMK (gruppo pre-100), alla concentrazione spermatica finale di  $30 \times 10^6$  spermatozoi/ml ed infialettate. Successivamente le paillettes sono state congelate secondo le procedure standard mediante un congelatore automatico programmabile (IMV technology, Francia). Per ogni pool, sul seme fresco sono state valutate la motilità con l'ausilio di un microscopio a contrasto di fase, la vitalità con la colorazione Trypan blue/Giemsa, l'integrità di membrana mediante Hypo-osmotic swelling test (HOS test) e la frammentazione del DNA con la colorazione Tunel, così come descritto successivamente. Per quanto riguarda il seme congelato, oltre ai parametri valutati sul seme fresco, sono stati analizzati la motilità mediante Sperm Class Analyzer (SCA), il potenziale di membrana mitocondriale con la colorazione JC-1 e l'attività della Caspasi 3 mediante citofluometria, sia allo scongelamento, sia dopo l'incubazione per 1 ora con 0, 20 µM e 100 µM Z-VAD-FMK. Ne consegue che, in aggiunta ai tre gruppi sperimentali pre-0, pre-20 e pre-100, gli spermatozoi dopo scongelamento sono stati incubati in 9 differenti condizioni sperimentali:

1. Pre-0/post-0, in cui gli spermatozoi del gruppo pre-0 sono stati incubati solo con lo Sperm Talp;
2. Pre-0/post-20, in cui gli spermatozoi del gruppo pre-0 sono stati incubati con lo Sperm- Talp addizionato di 20 µM Z-VAD-FMK;
3. Pre-0/post-100, in cui gli spermatozoi del gruppo pre-0 sono stati incubati con lo Sperm- Talp addizionato di 100 µM Z-VAD-FMK;
4. Pre-20/post-0, in cui gli spermatozoi del gruppo pre-20 sono stati incubati solo con lo Sperm- Talp;

5. Pre-20/post-20, in cui gli spermatozoi del gruppo pre-20 sono stati incubati con lo Sperm- Talp addizionato di 20  $\mu\text{M}$  Z-VAD-FMK;
6. Pre-20/post-100, in cui gli spermatozoi del gruppo pre-20 sono stati incubati con lo Sperm- Talp addizionato di 100  $\mu\text{M}$  Z-VAD-FMK;
7. Pre-100/post-0, in cui gli spermatozoi del gruppo pre-100 sono stati incubati solo con lo Sperm- Talp;
8. Pre-100/Post-20, in cui gli spermatozoi del gruppo pre-100 sono stati incubati con lo Sperm- Talp addizionato di 20  $\mu\text{M}$  Z-VAD-FMK;
9. Pre-100/post-100 in cui gli spermatozoi del gruppo pre-100 sono stati incubati con lo Sperm- Talp addizionato di 100  $\mu\text{M}$  Z-VAD-FMK.

### *5.1.2 Terreni e reagenti*

Tutti i prodotti chimici sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich/Merck (Milano, Italia) se non diversamente specificato. La Dnasi RNA-free e la RNase A sono state ottenute da Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, USA), mentre l'inibitore della caspasi Z-VAD FMK da Promega Corporation (Madison, WI, USA). È stata preparata una soluzione madre di 100 mM di Z-VAD-FMK in DMSO e successivamente da questo stock è stata effettuata una diluizione 1:5 per preparare la soluzione madre di 20 mM. Queste due soluzioni sono state aliquotate e conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al giorno dell'utilizzo. Per ottenere le concentrazioni desiderate (20 e 100  $\mu\text{M}$ ) e per ridurre al minimo la quantità di DMSO prima e post-scongelo, le soluzioni madre di Z-VAD-FMK sono state diluite 1:1000 nell'extender e nello Sperm-Talp.

### *5.1.3 Preparazione dei campioni spermatici prima dell'incubazione*

Gli spermatozoi di ciascun pool sono stati scongelati a  $37^{\circ}\text{C}$  per 40 secondi e selezionati tramite centrifuga (300g x 25 minuti) sui gradienti di Percoll (45 e 80%). Il pellet è stato poi risospeso in 2 ml di Sperm Talp e centrifugato nuovamente a 160 g per 10 minuti. Il pellet così ottenuto è stato incubato con 500  $\mu\text{l}$  di Sperm- Talp per 1 ora nelle 9 differenti condizioni sperimentali, prima descritte.

### *5.1.4 Valutazione della motilità*

Sia sul seme fresco che su quello congelato/scongelato, la motilità è stata valutata soggettivamente mediante una valutazione visiva utilizzando un

microscopio a contrasto di fase (Olympus, Tokyo, Giappone) con ingrandimento di 40x, mantenendo il campione ad una temperatura costante di 37°C. Inoltre, allo scongelamento e dopo l'incubazione la motilità progressiva e i parametri di cinetica spermatica sono stati valutati tramite il sistema computerizzato SCA (Microptic S.L. Barcelona, Spagna). In particolare, sono stati valutati i seguenti parametri di cinetica (Figura 5.1):

- VSL (velocità lineare dello spermatozoo; distanza rettilinea fra la prima e l'ultima posizione assunta dallo spermatozoo, diviso il tempo).
- VCL (velocità curvilinea; somma dei segmenti sottesi fra le varie posizioni della traiettoria dello spermatozoo, diviso il tempo).
- VAP (average path velocity; velocità media dello spermatozoo, data da lunghezza percorsa, diviso il tempo).
- ALH (ampiezza dello spostamento laterale della testa)

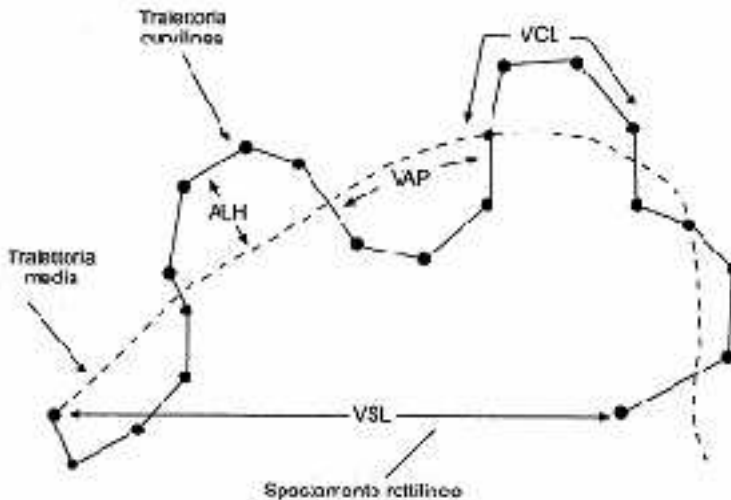


Fig. 5.1 Parametri cinetici Sperm Class Analyzer (SCA), da Fabbris et al., 2001

La motilità progressiva è stata valutata come la differenza tra il numero di spermatozoi considerati motili (con  $VAP \geq$  ad un valore di riferimento per la specie bovina) ed il numero di spermatozoi motili con rapporto  $VSL/VAP$  inferiore all'80%. L'analisi è stata effettuata con microscopio invertito Nikon TE 2000 collegato ad una fotocamera Basler Vision Technology A312 fc con un obiettivo 10x a contrasto di fase positivo tramite lo SCA provvisto di un tavolino termoregolato a 37°C. Dieci microlitri di ogni

campione sono stati caricati sulla camera di Makler, precedentemente riscaldata a 37°C, e per ogni punto temporale sono state acquisite e analizzate almeno 400 cellule.

#### *5.1.5 Valutazione della vitalità mediante colorazione Trypan blue/Giemsa*

La vitalità è stata valutata mediante la tecnica Trypan blue/Giemsa riportata da Boccia et al. (2007). La soluzione di Trypan blue allo 0.27 % è stata ottenuta aggiungendo 1 ml di Trypan blue (0.4%) a 1 ml di fisiologica (0.9% NaCl). Il fissativo è stato ottenuto aggiungendo 86 ml di una soluzione 1 N di HCl a 14 ml di una soluzione al 37% di Formaldeide con l'aggiunta di 0.2 g di Neutral red. La colorazione Giemsa è stata preparata fresca prima dell'uso aggiungendo 7.5% di una soluzione Giemsa stock ad acqua distillata. Una goccia di Trypan blue allo 0.27% ed una goccia di seme diluito sono state deposte sul bordo di un vetrino; utilizzando un altro vetrino le due gocce sono state mescolate e strisciate, mantenendo i due vetrini in posizione parallela l'uno all'altro durante lo striscio. In questo modo sono stati preparati due vetrini per ciascun campione. Dopo lo striscio i vetrini sono stati asciugati all'aria in posizione verticale. I vetrini sono stati posti in giare sterili contenenti il fissativo per 2 minuti e poi lavati con acqua distillata. I vetrini sono stati, quindi, immersi per tutta la notte in giare contenenti il colorante Giemsa. Dopo la colorazione i vetrini sono stati ancora una volta lavati con acqua distillata e lasciati asciugare all'aria verticalmente. Sui vetrini è stato posizionato un coprioggetto con Entellan. La lettura degli spermatozoi è stata eseguita al microscopio utilizzando un ingrandimento 40x. La colorazione ha permesso di evidenziare le seguenti categorie cellulari: spermatozoi vivi che mostravano sia la testa che la coda vitali (di colore rosa) e spermatozoi morti che presentavano la testa o la coda non vitali (nero-viola scuro; Figura 5.2)

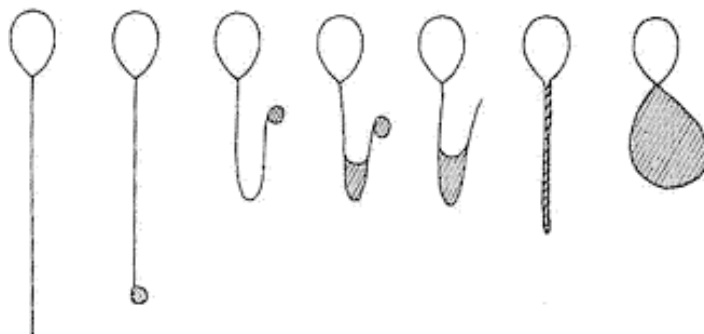


Fig. 5.2 Spermatozoi vivi e morti evidenziati con la colorazione Trypan blue/Giemsa.

#### 5.1.6 Valutazione dell'integrità di membrana mediante hypo-osmotic swelling test (HOS test)

Per valutare l'integrità di membrana degli spermatozoi è stato utilizzato l'Hos test (Correa et al., 1994). Il funzionamento di questo test si basa sul comportamento che assumono gli spermatozoi in una soluzione ipo-osmotica. Se la membrana è integra, il contatto con l'ambiente ipo-osmotico causerà un rigonfiamento degli spermatozoi a livello della coda. Se la membrana ha una funzionalità alterata, invece, gli spermatozoi non si rigonfieranno poiché l'equilibrio osmotico è raggiunto attraverso la perdita di soluti (Drevius and Erikson, 1966; Figura 5.3). Un eiaculato può essere considerato di buona qualità se ha almeno il 60% degli spermatozoi positivi a HOS test. La soluzione ipo-osmotica (150 mOsm) è stata ottenuta sciogliendo 0,735 gr. di Citrato di Sodio Bi-idrato ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + 2\text{H}_2\text{O}$ ) e 1,351 gr. di fruttosio in 100 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata. Cento microlitri di campione vengono incubati per 45 minuti a  $37^\circ\text{C}$  in 1 ml di soluzione ipo-osmotica precedentemente riscaldata. Una goccia di 20  $\mu\text{l}$  di seme è posta su di un vetrino su cui sarà apposto un vetrino copri oggetto. Un totale di

200 spermatozoi per vetrino sono stati osservati con un microscopio a contrasto di fase con ingrandimento 40x. Il risultato è stato espresso come percentuale di spermatozoi rigonfi, sul totale di quelli contati (Fabbris et al., 2001).



*Fig. 5.3 Il primo spermatozoo a sinistra è normale, le altre sono tutte cellule positive all'HOS test.*

#### *5.1.7 Valutazione della frammentazione del DNA mediante colorazione Tunel e Hoechst 33342*

La quantità di frammentazione del DNA è stata determinata tramite la colorazione Tunel (Talevi et al., 2013), utilizzando un kit disponibile in commercio (In Situ Cell Death Detection Kit, fluorescein, Roche, Indianapolis, IN, USA). Per ogni campione, 100  $\mu$ l di spermatozoi, separati mediante i gradienti di Percoll, sono stati fissati con 100  $\mu$ l di paraformaldeide al 4 % (PFA) in PBS (pH 7.4) e incubati per 30 min a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, gli spermatozoi sono stati lavati due volte (300g x 15 min) in PBS+PVP (1mg/1ml), il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato diluito (1:10) con PBS+PVP. Una goccia di seme (20  $\mu$ l) è stata strisciata su un vetrino pulito che è stato permeabilizzato con 0.1% (v/v) Triton X-100 contenente 0.1% (w/v) di Sodio Citrato per 10 minuti. I vetrini sono stati lavati per due volte in PBS e fatti asciugare all'aria. Prima dell'incubazione con la soluzione Tunel, due vetrini, uno per il controllo positivo e l'altro per il controllo negativo, sono stati incubati per 20 minuti a 37 °C con 50  $\mu$ l di DNase I ricombinante (8U/1 l) (Roche 10.000 U), lavati in PBS per due volte e fatti asciugare all'aria. Il controllo negativo è stato incubato con 50  $\mu$ l della Label Solution, in assenza di enzima, al buio per 1 ora a 37 °C in una camera umidificata. Il controllo positivo e tutti i

campioni, invece, sono stati incubati con 50  $\mu$ l della Mix Tunel al buio per 1 ora a 37 °C in una camera umidificata. Una volta completata la colorazione, ogni vetrino è stato lavato due volte in PBS e fatto asciugare all'aria. Successivamente, i vetrini sono stati incubati con 50  $\mu$ l di Hoechst 33342 (1 mg/ml) per 30 minuti a temperatura ambiente e al buio. Dopo sono stati lavati per due volte in PBS, fatti asciugare all'aria e montati con una goccia di 1,4-diazabicyclo-octane (DABCO) e coperti con un vetrino coprioggetto. Ogni vetrino è stato analizzato per un totale di 200 spermatozoi (nuclei blu) e spermatozoi Tunel-positivi (nuclei verdi) con i filtri di eccitazione DAPI (460 nm per la fluorescenza blu) e filtri FITC (520 nm per la fluorescenza verde), rispettivamente, usando un microscopio a fluorescenza (Eclipse E-600; Nikon, Japan) con un ingrandimento di 40x. Il risultato è espresso come percentuale di spermatozoi Tunel + (con nucleo verde) su spermatozoi totali.

#### 5.1.8 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\Psi_m$

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato valutato tramite la colorazione JC-1 (5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylimidacarbocyanine iodide; Thermofisher Scientific, T3168), come descritto in precedenza (Ortega-Ferrusola et al., 2008; Katherine et al., 2009). Il JC-1 ha la capacità unica di marcare in modo diverso i mitocondri con basso e alto potenziale di membrana mitocondriale. Nei mitocondri ad alto  $\Delta\Psi_m$ , JC-1 forma aggregati multimerici che emettono una fluorescenza rossa/arancione (590nm). Se eccitati simultaneamente da sorgenti laser a ioni argon a 488 nm, i monomeri e gli aggregati possono essere rilevati separatamente al citofluorimetro nei canali FL1 e FL2, rispettivamente. Gli spermatozoi (500  $\mu$ l) separati mediante procedura Percoll e divisi per i gruppi sperimentali così come descritto in precedenza, sono stati incubati per 15 minuti a 37°C al buio con 0,5  $\mu$ l di JC-1 (2 mM). Alla fine dell'incubazione, i campioni sono stati analizzati mediante il citofluorimetro FACSCaliburT (BD Biosciences, San Josè, CA, USA). In questo esperimento sono stati analizzati 50000 eventi per campione. In questo modo, sono state identificate 3 sottopopolazioni di spermatozoi: spermatozoi con alto  $\Delta\Psi_m$  (fluorescenza rossa/arancione), spermatozoi con basso  $\Delta\Psi_m$  (fluorescenza verde) e spermatozoi con mitocondri eterogenei, con alto e basso  $\Delta\Psi_m$  (fluorescenza rossa/arancione e verde contemporaneamente).

### 5.1.9 Citofluometria per Caspasi 3

Per analizzare la forma attivata della caspasi 3 è stato utilizzato l'anticorpo FITC Rabbit Anti-Active Caspase-3 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Questo anticorpo è stato marcato per riconoscere specificamente la forma attiva di caspasi 3 e non la forma pro-enzima di caspase 3 (Armstrong et al., 1997).

Gli spermatozoi separati mediante procedura Percoll e divisi per i gruppi sperimentali, così come descritto in precedenza, sono stati diluiti 1:1 con il fissativo BD Cytotfix Fixation buffer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e incubati per 10 minuti a 37°C. Dopo l'incubazione, sono stati centrifugati per due volte (16000 g x 10 minuti) per eliminare il fissativo in eccesso, il pellet è stato poi risospeso con 100 µl di permeabilizzante BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ed è stato incubato per 30 minuti in ghiaccio. Il pellet è stato poi lavato due volte con PBS+PVP (16000g x 10 min) per eliminare l'eccesso di permabilizzante, e sono stati aggiunti 20 µl dell'anticorpo primario FITC Rabbit Anti-Active Caspase 3 per 2 ore a temperatura ambiente. Il pellet è stato nuovamente lavato due volte con PBS+PVP (16000 g x 10 min) per eliminare l'eccesso di anticorpo e sono stati aggiunti 500 µl di Ioduro di Propidio (PI ; 10µg/ml) per 3 ore circa a temperatura ambiente. Alla fine dell'incubazione, i campioni sono stati analizzati mediante il citofluorimetro FACSCaliburT (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). In questo esperimento sono stati analizzati 20000 eventi per campione.



### 5.2 Analisi statistica

Le differenze di motilità, vitalità, integrità di membrana e frammentazione del DNA tra seme fresco e congelato sono stata analizzate mediante il test T di Student. Le differenze tra i gruppi allo scongelamento e post incubazione sono state confrontate tramite l'analisi della varianza (ANOVA), con il metodo Tukey utilizzato come Test Post Hoc. Le differenze tra i gruppi sono state considerate significative, con il valore di  $P < 0.05$ .

### 5.3 Risultati

L'analisi dei parametri di fertilità del seme fresco è stata effettuata al fine di conoscere la qualità del materiale seminale prima della crioconservazione. I parametri registrati per motilità, vitalità, integrità di membrana e percentuale di frammentazione del DNA (Tabella 5.1) attestano una buona qualità del materiale seminale di partenza. Tuttavia, il congelamento ha determinato una riduzione sia della motilità ( $P < 0.05$ ), valutata soggettivamente, che dell'integrità di membrana ( $P < 0.05$ ), mentre nessuna differenza è stata riportata per la vitalità (Tabella 5.1). La percentuale di frammentazione del DNA è invece aumentata drasticamente ( $P < 0.01$ ) nel seme congelato rispetto a quello fresco (Tabella 5.1).

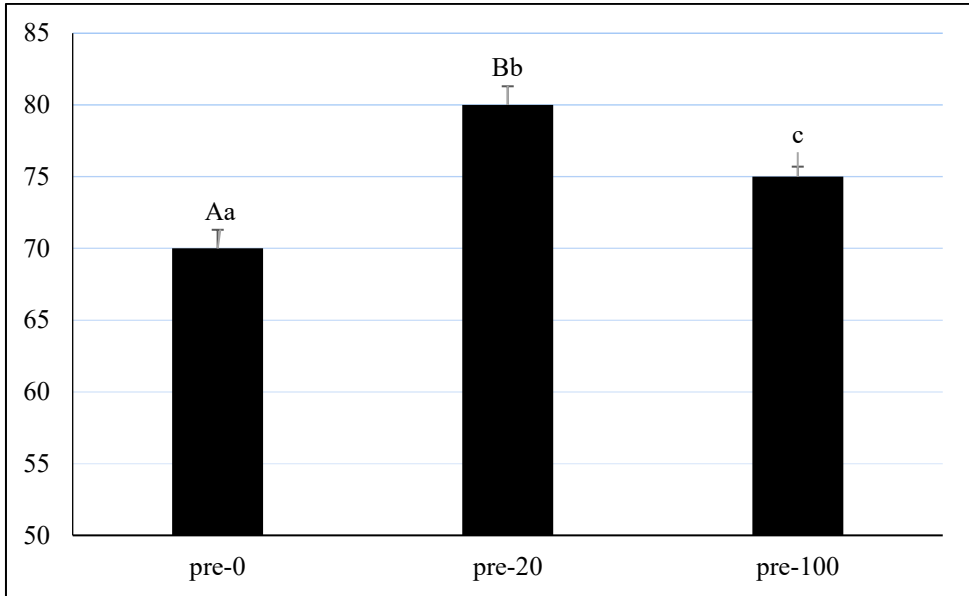
Tab. 5.1 Percentuali di motilità, vitalità, integrità di membrana (HOS+) e frammentazione del DNA (Tunel+) nel seme fresco e in quello congelato.

Gruppo	% Motilità	% Vitalità	% HOS	% Tunel +
Fresco	73.3 ± 1.1 <sup>a</sup>	89.3 ± 1.9	73.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.6 <sup>A</sup>
Congelato	70.0 ± 1.05 <sup>b</sup>	86.3 ± 1.3	67.1 ± 1.5 <sup>b</sup>	15.4 ± 2.8 <sup>B</sup>

<sup>A,B</sup> I valori all'interno di una colonna con apice differente indicano differenze significative a  $P < 0,01$

<sup>a,b</sup> I valori all'interno di una colonna con apice differente indicano differenze significative a  $P < 0,05$

Come si evince dalla Figura 5.4, il trattamento con entrambe le concentrazioni di Z-VAD-FMK prima della crioconservazione ha incrementato significativamente la motilità spermatica allo scongelamento, valutata mediante microscopia al contrasto di fase, rispetto al controllo ( $P < 0,05$ ). Al di là dei valori numerici, nei gruppi trattati il pattern di motilità era diverso rispetto al controllo, in quanto gli spermatozoi si muovevano energicamente con un andamento a scatti. È interessante rilevare che in tutti i gruppi trattati con Z-VAD-FMK non è stato possibile elaborare i dati raccolti con lo SCA poiché la percentuale di spermatozoi agglutinati, adesi tra loro ma motili era  $>$  del 70% rispetto al numero totali di spermatozoi.



<sup>a,b</sup> Barre contrassegnate con lettere diverse sono significativamente differenti;  $P < 0,05$

<sup>A,B</sup> Barre contrassegnate con lettere diverse sono significativamente differenti;  $P < 0,01$

Fig. 5.4. Motilità allo scongelamento di spermatozoi bovini trattati con 0, 20 e 100  $\mu\text{M}$  prima del congelamento.

La vitalità valutata tramite la colorazione Trypan blue/Giemsa è risultata alta in tutti i gruppi allo scongelamento. Similarmente, nessuna variazione significativa dell'integrità di membrana è emersa come mostrato in Tabella 5.2.

Tab. 5.2 Percentuali di vitalità e integrità di membrana (HOS+) nei gruppi trattati con 0, 20 e 100  $\mu\text{M}$  prima del congelamento.

Gruppo	% Vitalità	% HOS
Pre-0	87.1 $\pm$ 1.0	67.1 $\pm$ 1.2
Pre-20	84.3 $\pm$ 1.0	71.5 $\pm$ 1.7
Pre-100	85.0 $\pm$ 2.4	68.8 $\pm$ 1.1

Sebbene l'analisi dei dati non abbia evidenziato differenze significative nella percentuale di spermatozoi con DNA frammentato tra i gruppi pre-congelamento, la percentuale di frammentazione tende a diminuire in maniera dose-dipendente all'aumentare della concentrazione dell'inibitore, come mostrato nella Figura 5.5. Inoltre, è stato osservato che il trattamento con 100  $\mu\text{M}$  di Z-VAD-FMK ha incrementato la percentuale di spermatozoi con alto potenziale di membrana mitocondriale in maniera significativa ( $P < 0.05$ ) rispetto al trattamento con la concentrazione inferiore dell'inibitore e rispetto al gruppo controllo ( $P = 0.08$ ), come illustrato nella Figura 5.6. Inoltre, nessuna differenza è stata evidenziata nella percentuale di spermatozoi con attività caspatica tra tutti i gruppi pre-congelamento ( $0.2 \pm 0.1$ ,  $2.7 \pm 1.9$  e  $3.1 \pm 1.9$  nei gruppi Pre-0, Pre-20 e Pre-100, rispettivamente).

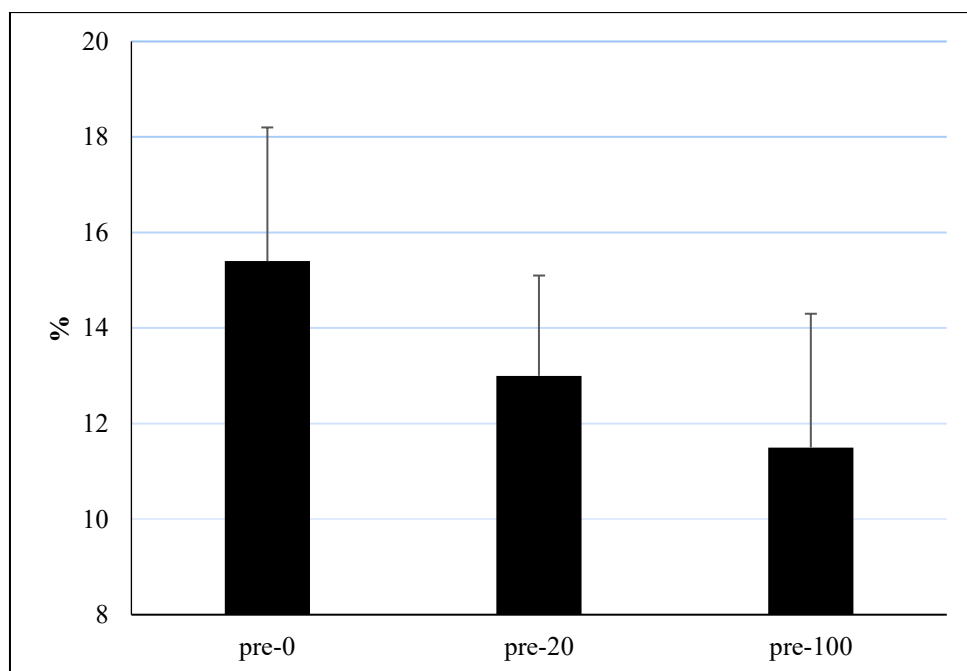
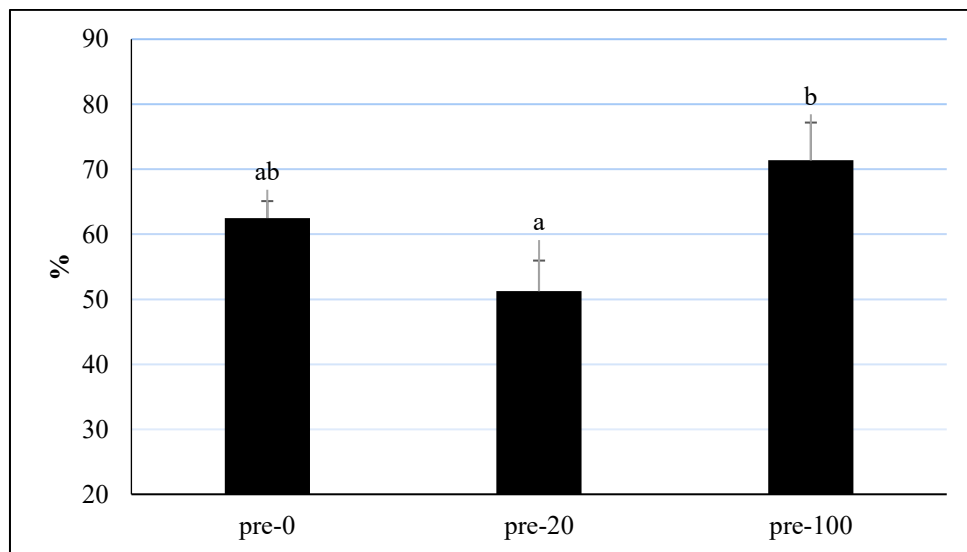


Fig. 5.5 Percentuale di spermatozoi con DNA frammentato nei gruppi trattati con 0, 20 e 100  $\mu\text{M}$  prima del congelamento.



<sup>a,b</sup> Barre contrassegnate con lettere diverse sono significativamente differenti;  $P < 0,05$

*Fig. 5.6 Percentuale di spermatozoi con alto potenziale di membrana mitocondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) nei gruppi trattati con 0, 20 e 100  $\mu\text{M}$  prima del congelamento.*

Per quanto riguarda i gruppi post-incubazione, è stato osservato un incremento della motilità spermatica quando il seme veniva pre-trattato con 20  $\mu\text{M}$  di Z-VAD-FMK e successivamente incubato con l'inibitore ad entrambe le concentrazioni di Z-VAD-FMK testate, rispetto al gruppo controllo pre-0-post-0 (Tabella 5.3).

Quando il seme non veniva trattato prima del congelamento (gruppi pre-0), l'incubazione con ZVAD non ha esercitato alcuna influenza sulla vitalità spermatica (Tabella 5.3). Invece, quando il seme veniva pre-trattato con 20  $\mu\text{M}$  di Z-VAD-FMK (gruppi pre-20) l'incubazione successiva con 100  $\mu\text{M}$  di Z-VAD-FMK determinava un incremento della vitalità. Al contrario, nel caso del seme pre-trattato con 100  $\mu\text{M}$  di Z-VAD-FMK (gruppi pre-100), l'incubazione con l'inibitore ha determinato un decremento della vitalità.

Un aumento significativo della percentuale di spermatozoi con membrana integra è stato osservato nei gruppi Pre-0/post-20 ( $p < 0,05$ ) e Pre-0/post-100 ( $P < 0,01$ ; Tabella 5.3) rispetto al gruppo Pre-0/post-0 post incubazione. Similmente è stato evidenziato un aumento dell'integrità di membrana, dopo l'incubazione, per i gruppi Pre-20/post-100, Pre-100/post-20 e Pre-100/post-100 rispetto al controllo non trattato (Tabella 5.3).

Nel caso in cui il seme era stato trattato prima del congelamento (gruppi pre-0), l'incubazione con entrambe le concentrazioni di Z-VAD-FMK ha comportato un aumento significativo della percentuale di spermatozoi con membrana integra rispetto al controllo non trattato (pre-0/post-0). Invece, in entrambi i gruppi in cui il seme era stato pre-trattato con Z-VAD-FMK non è stata riscontrata alcuna differenza nell'integrità di membrana imputabile alla successiva incubazione con Z-VAD-FMK. Tuttavia, in generale è stato osservato un miglioramento dell'integrità di membrana nei gruppi post-incubazione in presenza dell'inibitore Z-VAD-FMK (Tabella 5.3). Per quanto concerne gli altri parametri esaminati, l'unica differenza rilevata riguardava la percentuale di frammentazione del DNA all'interno dei gruppi pre-0, che risultava diminuita dopo incubazione con 100  $\mu$ M di Z-VAD-FMK, rispetto al controllo pre-0-post-0 (Tabella 5.4). Tra tutti i gruppi di post-incubazione, non sono state registrate differenze nelle percentuali di spermatozoi che mostravano un alto potenziale di membrana né tantomeno in quelle di spermatozoi con caspasi 3 attiva (Tabella 5.4).

### Esperimento 3

Tab. 5.3 Percentuali di motilità, vitalità e integrità di membrana (HOS+) nelle diverse condizioni sperimentali di incubazione.

Gruppo	% Motilità	% Vitalità	% HOS+
Pre-0/post-0	60.0 ± 4.5 <sup>Aa</sup>	82 ± 0.46 <sup>A</sup>	60.5 ± 3.47 <sup>Aa</sup>
Pre-0/post-20	62.5 ± 5.6 <sup>a</sup>	82.31 ± 1.68	70.92 ± 1.25 <sup>b</sup>
Pre-0/post-100	67.5 ± 3.4	85.5 ± 1.79	74.25 ± 2.12 <sup>B</sup>
Pre-20/post-0	65.0 ± 2.2	79.92 ± 1.63 <sup>A</sup>	71 ± 1.73
Pre-20/post-20	70.0 ± 4.5 <sup>b</sup>	85.58 ± 0.99	68.25 ± 1.53
Pre-20/post-100	75.0 ± 2.2 <sup>Bb</sup>	88.5 ± 0.97 <sup>B</sup>	70.67 ± 2.15 <sup>B</sup>
Pre-100/post-0	69.2 ± 2.0	89.75 ± 0.38 <sup>B</sup>	69.5 ± 1.07
Pre-100/post-20	69.2 ± 2.0	82.75 ± 0.74 <sup>A</sup>	71.22 ± 1.45 <sup>B</sup>
Pre-100/post-100	69.2 ± 2.0	83.42 ± 1.45 <sup>A</sup>	72.75 ± 0.28 <sup>B</sup>

<sup>a,b</sup> I valori all'interno di una colonna con apice differente indicano differenze significative a P < 0,05

<sup>A,B</sup> I valori all'interno di una colonna con apice differente indicano differenze significative a P < 0,01

## Esperimento 3

*Tab. 5.4 Percentuali di spermatozoi con DNA frammentato (Tunel +), alto potenziale di membrana (JC-1 +) e caspasi 3 attiva (caspasi +) nelle diverse condizioni sperimentali post-incubazione.*

Gruppo	% Tunel +	% JC-1+	% Caspasi+
Pre-0/post-0	17.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	62.4 ± 12.68	0.18 ± 0.09
Pre-0/post-20	13.3 ± 2.8	57.93 ± 12.85	0.22 ± 0.12
Pre-0/post-100	10.5 ± 2.5 <sup>b</sup>	50.75 ± 8.82	0.37 ± 0.21
Pre-20/post-0	12.6 ± 3.1	46.63 ± 5.61	1.04 ± 0.59
Pre-20/post-20	13.0 ± 2.4	42.43 ± 8.07	0.29 ± 0.07
Pre-20/post-100	14.8 ± 3.7	45.5 ± 6.46	0.29 ± 0.07
Pre-100/post-0	14.2 ± 2.7	61.28 ± 11.7	1.31 ± 1.17
Pre-100/post-20	15.7 ± 3.4	55.45 ± 8.26	0.75 ± 0.54
Pre-100/post-100	10.7 ± 3.8	61.38 ± 8.83	0.21 ± 0.00

<sup>a,b</sup> I valori all'interno di una colonna con apice differente indicano differenze significative a P <0,05



## 5.4 Discussione

È ben noto che la crioconservazione e/o lo scongelamento ha un effetto dannoso sulla vitalità degli spermatozoi a causa della formazione di cristalli ghiaccio che possono danneggiare la membrana, alterare il citoscheletro e la funzionalità degli organelli citoplasmatici (Aziz et al., 2004). Le modificazioni della permeabilità della membrana, il danno mitocondriale e lo stress ossidativo inducono l'attivazione di una serie di eventi che terminano con la morte cellulare (Wyllie et al., 1980). È stato evidenziato che la degenerazione cellulare causata dagli insulti relativi alla procedura di crioconservazione e di scongelamento del seme avviene prevalentemente attraverso il meccanismo dell'apoptosi (Martin et al. 2004). In particolare, è stato riportato che la crioconservazione del seme bovino si traduce in un aumento di alcune caratteristiche tipiche del processo apoptotico, quali alterazioni del potenziale di membrana mitocondriale, esternalizzazione della fosfatidilserina, aumento della permeabilità di membrana, con conseguente attivazione delle caspasi (Martin et al. 2004). Sulla base di queste premesse, la domanda che ci siamo posti in questo esperimento è stata quella di verificare se il trattamento del seme con l'inibitore delle caspasi, Z-VAD-FMK, prima e dopo il congelamento, migliora le caratteristiche qualitative del seme. A tale fine l'inibitore delle caspasi è stato utilizzato a due diverse concentrazioni (20 e 100  $\mu\text{M}$ ) sia nell'extender prima del congelamento, sia dopo lo scongelamento. L'effetto dell'inibitore apoptotico sul gamete maschile è stato valutato sulla motilità, vitalità, integrità di membrana, frammentazione del DNA, potenziale di membrana e attività caspasicca, con particolare riferimento alla caspasi 3, coinvolta maggiormente nei danni da congelamento.

Il confronto tra il seme fresco e quello congelato ha mostrato che il congelamento riduce la motilità e la percentuale di spermatozoi con membrana integra, modificazioni che, come è noto, possono condizionare le capacità fecondanti del seme (Medeiros et al., 2002). Invece, il congelamento non ha influenzato in maniera significativa la vitalità spermatica, che è rimasta molto alta (86%), ad indicare un'alta qualità del materiale di partenza. Ciononostante, la crioconservazione ha incrementato del 14% la percentuale di spermatozoi che mostravano frammentazione del DNA. È noto che la frammentazione del DNA può dipendere dalla destabilizzazione dei mitocondri, con conseguente rilascio del citocromo-C e attivazione della cascata delle proteine caspasi, esitanti nella morte cellulare (Anzar et al., 2002). Baccetti et al., (1996) e Blanch-Layrac et al.,

(2000), con l'ausilio del microscopio elettronico, hanno descritto, oltre alla frammentazione del DNA, altre alterazioni, come la condensazione della cromatina, formazioni lobulari dell'acrosoma, gonfiore della membrana dei mitocondri ed una certa attivazione dei macrofagi, tutte condizioni che ulteriormente possono alterare la qualità del seme ed influenzare la fertilità. I dati ottenuti nel corso dell'esperimento hanno disatteso l'ipotesi di partenza, in quanto l'utilizzo dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK non si è rivelato efficace nel prevenire l'apoptosi indotta dal freddo e, quindi, nel migliorare i parametri di fertilità. In particolare, un dato inatteso riguarda, analogamente, però, a quanto riscontrato nell'esperimento 2 sugli oociti, l'inefficacia di Z-VAD-FMK nell'inibire l'attività caspasi, come attestato dall'assenza di differenze tra i vari gruppi nella percentuale di spermatozoi che esprimevano la forma attiva di caspasi 3. Purtroppo, in questo studio, per motivi logistici, non è stato possibile effettuare la determinazione dell'attività caspasi sul seme fresco e, quindi, non abbiamo evidenza di un'attivazione delle stesse causata dalla procedura di crioconservazione, dimostrata tuttavia da altri autori in studi precedenti (Martin et al 2004). Dalal et al., (2018), hanno osservato che il congelamento induce un aumento significativo degli spermatozoi che esprimevano la forma attiva di caspasi 3 ed hanno evidenziato che caspasi 3 era espressa nella porzione intermedia dello spermatozoo. La cosa interessante è che gli spermatozoi che esprimevano caspasi 3 non presentavano nessuna presenza di gocce citoplasmatiche o rigonfiamenti della membrana che sono da associare a cellule in apoptosi. Questa osservazione, suggerisce un potenziale ruolo non apoptotico delle caspasi nell'eiaculato di alta qualità, suggerendo che la presenza dell'attivazione delle caspasi 3 negli spermatozoi non è solo associata ad una condizione di alterazione funzionale (Dalal et al., 2018). L'assenza di una variazione dell'attività di caspasi 3 nei diversi gruppi potrebbe verosimilmente dipendere dall'inadeguatezza della dose impiegata, analogamente a quanto evidenziato nell'esperimento sugli oociti. I risultati dell'esperimento 2 in realtà ci avevano indotti ad utilizzare anche un'altra concentrazione, anch'essa risultata però inefficace. D'altra parte, l'apoptosi è la risultante di un equilibrio tra fattori pro-apoptotici ed anti-apoptotici; pertanto, non è possibile escludere che il livello di attivazione delle caspasi si sia mantenuto basso a causa del legame tra le proteine inibitrici dell'apoptosi, XIAP (X-linked IAP o nota anche come BIRC4) e cIAP1 (nota anche come BIRC2) con caspasi 3. Un effetto di ZVAD su alcuni parametri spermatici è stato evidenziato soprattutto quando l'inibitore è stato inserito nell'extender prima che il seme

fosse sottoposto al congelamento. In particolare, infatti, il trattamento ha determinato un incremento significativo della motilità di massa post-scongelo, con una tendenza alla riduzione del tasso di frammentazione del DNA e all'aumento del potenziale di membrana mitocondriale, soprattutto con la concentrazione più elevata. Una riduzione significativa della percentuale di spermatozoi che mostravano frammentazione del DNA, unitamente all'aumento degli spermatozoi con membrana integra, è stata anche osservata quando il seme è stato trattato solo dopo scongelamento per 1 ora con la concentrazione più elevata di Z-VAD-FMK. Le altre differenze rilevate nei gruppi post-incubazione non sono rilevanti. Nella nostra esperienza questi risultati comunque devono essere considerati con cautela, in quanto le variazioni rilevate nei parametri spermatici non sempre si accordano all'interno di ciascun gruppo sperimentale. D'altra parte l'aggiunta di inibitori delle caspasi nell'extender non si è rivelata una strategia vincente ai fini del miglioramento della criotolleranza degli spermatozoi di ariete, cane e stallone (Marti et al., 2008; Peter and Linde-Forsberg 2003; Peter et al., 2005). Al contrario, un effetto positivo è stato descritto sul seme di bufalo, utilizzando un inibitore delle caspasi a concentrazioni molto più basse (Dalal et al. 2018).

In conclusione, la strategia di prevenzione dell'apoptosi indotta dalla crioconservazione, mediante l'impiego dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK prima e/o dopo il congelamento del seme bovino non è risultata particolarmente efficace. Tale insuccesso sembra verosimilmente attribuibile all'inadeguata dose d'impiego dell'inibitore stesso, in quanto non si è descritta una riduzione di caspasi 3 attiva in nessuno dei gruppi trattati. Tuttavia non è possibile escludere che l'individuazione di una dose efficace e di diversi tempi di trattamento possano produrre, invece, gli effetti desiderati.

- Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP; 2002 Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod* 66:354–360.
- Armstrong RC, Aja TJ, Hoang KD, Gaur S, Bai X, Alnemri ES, Litwack G, Karanewsky DS, Fritz LC and Tomaselli KJ; 1997. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Neurosci.* 17: 553- 562.
- Aziz N , Saleh RA , Sharma RK; 2004. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index . *Fertil. Steril.*, 81:2 349-354.
- Baccetti B, Collodel G, Piomboni P; 1996. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol.* 28: 587–596.
- Blanc-Layrac G, Bringuier AF, Guillot R, Feldmann G; 2000. Morphological and biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cell Mol Biol. (Noisy-le-grand).* 46:187–197.
- Boccia L, Di Palo R, De Rosa A, Attanasio L, Mariotti E, Gasparini B; 2007. Evaluation of buffalo semen by Trypan blue/Giemsa staining and related fertility in vitro. *Ital. J. Anim. Sci.*, 6 (2): 739–742.
- Correa JR and Zavos PM; 1994. The Hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology.* vol.42 (2) 351-360.
- Dalal J, Kumar A, Honparkhe M, Singh AK, Brar PS; 2018. Minimization of apoptosis-like changes developed during cryopreservation of buffalo bull sperm by supplementing Z-LEHD-FMK (Caspase inhibitor). *Int.J Curr.Microbiolog.App.Shi* 7(9):1076-1084.
- Drevius L and Erikson H; 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa”; *Experimental Cell Research.* 42: 135-156.
- Fabbris GFM, Valiani S; 2001. *Manuale di laboratorio della WHO per l’esame del liquido seminale umano e dell’interazione tra spermatozoi e muco cervicale.* 37 1,1-124.
- Katherine E.M. Hendricks, Peter J. Hansen. 2009. Can programmed cell death be induced in post-ejaculatory bull and stallion spermatozoa? *Theriogenology* ;71: 1138–1146.
- Marti E, Perez-Pe R, and Colas C; (2008). Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci,* 106:113–132.
- Martin G, Sabido O, Durand P and Levy R; 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod.* 71,28–37.

- Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL; 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 57:327–344.
- Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Gala' n Y, Varela-Fernandez E; Gallardo-Bolanos JM, Muriel A, Gonzalez-Fernandez L; 2008, Detection of "Apoptosis-Like" Changes During the Cryopreservation Process in Equine Sperm *Journal of Andrology*, 29. 2.
- Peter AT, Colenbrander B, Gadella BM; 2005. Effect of caspase inhibitors on the post Fthaw motility, and integrity of acrosome and plasma membrane of cryopreserved equine spermatozoa. *Indian J Exp Biol*. 43:483 F7.
- Peter AT, Linde F and Forsberg C; 2003. Efficacy of the anticaspase agent zVADFmk on post Fthaw viability of canine spermatozoa vi et al.
- Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Longobardi S, and Gualtieri R; 2013. Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation *Reprod Biol Endocrinol*. 11: 81.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR; 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 68:251–306.



Il razionale di questo lavoro nasceva dalle recenti evidenze in merito al ruolo pivotale giocato dalle proteine della famiglia caspasi, in particolare la caspasi 3, nel fenomeno dell'apoptosi indotta dal congelamento. Un'attivazione anomala del pathway apoptotico conseguente alla crioconservazione è stata, infatti, descritta in diversi tipi cellulari, inclusi embrioni e gameti, ed è stata associata alla riduzione della sopravvivenza al congelamento. Queste osservazioni hanno posto le basi per lo sviluppo di strategie volte alla prevenzione dell'apoptosi da freddo, mediante trattamento con inibitori delle caspasi prima di sottoporre le cellule alla procedura della crioconservazione. In particolare, l'utilizzo di inibitori delle caspasi si è rivelato efficace per migliorare la criotolleranza di embrioni ed oociti nella specie suina (Men et al., 2003; Vallorani et al., 2012), mentre risultati contrastanti sono stati ottenuti sulla fertilità post-congelamento degli spermatozoi in specie diverse, quali il cane e il bufalo (Peter et al., 2005; Dalal et al., 2018). Poiché tale strategia non era stata ancora investigata nella specie bovina, lo scopo della tesi è stato proprio di verificare l'efficacia dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK nel prevenire l'apoptosi indotta e migliorare la criotolleranza degli embrioni e dei gameti bovini.

I risultati dell'esperimento 1 hanno dimostrato che l'inclusione dell'inibitore delle caspasi ZVAD-FMK nei media prima, durante e dopo la crioconservazione, migliora effettivamente la criotolleranza degli embrioni bovini prodotti in vitro, riducendo l'apoptosi indotta da crioconservazione. E' stato, infatti, dimostrato che negli embrioni trattati con ZVAD-FMK si osserva una diminuzione dell'indice di frammentazione del DNA, in linea con la riduzione delle aree embrionali interessate dall'attività della caspasi 3. Inoltre la migliore criotolleranza embrionale, attestata dalle elevate percentuali di sopravvivenza, sviluppo e schiusa dopo 24 e 48 ore di coltura post-riscaldamento, nonché dall'appropriato rapporto tra cellule del nodo embrionale e del trofotoderma, confermano che la prevenzione dell'apoptosi è una strategia efficace per il congelamento di embrioni bovini prodotti in vitro.

Al contrario, i risultati del trattamento sui gameti indicano che, almeno alle dosi e nei modi impiegati, il trattamento con ZVAD-FMK è inefficace proprio sull'inibizione dell'attività caspasi. I risultati dell'esperimento 2 hanno dimostrato innanzitutto che, contrariamente a quanto atteso, la crioconservazione non ha comportato un'attivazione delle caspasi. E' stato, però, provato che la vitrificazione determina danni a livello del DNA e del potenziale di membrana mitocondriale, che si traducono in una ridotta

sopravvivenza e competenza allo sviluppo degli oociti bovini, attestata dalla riduzione dei tassi di cleavage e blastocisti. Inoltre, l'ipotesi del lavoro non è stata confermata, in quanto l'esposizione degli oociti all'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK prima, durante e dopo la vitrificazione, non ha determinato una riduzione dell'apoptosi indotta dalla crioconservazione, intesa come frammentazione del DNA, né ha migliorato la resistenza degli oociti al processo di crioconservazione, valutata come sopravvivenza post-riscaldamento, e competenza allo sviluppo dopo fecondazione in vitro. Analogamente, nell'esperimento 3, il trattamento con ZVAD-FMK non ha apportato effetti benefici sulla criotolleranza spermatica. Anche in questo caso, infatti, i dati ottenuti nel corso dell'esperimento hanno disatteso l'ipotesi di partenza, in quanto l'utilizzo dell'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK non si è rivelato efficace nel prevenire l'apoptosi indotta dal freddo e, quindi, nel migliorare i parametri di fertilità. In particolare, un dato inatteso riguarda, analogamente, però, a quanto riscontrato nell'esperimento 2 sugli oociti, l'inefficacia di Z-VAD-FMK nell'inibire l'attività caspasi, come attestato dall'assenza di differenze tra i vari gruppi nella percentuale di spermatozoi che esprimevano la forma attiva di caspasi 3. Ciò potrebbe essere imputabile all'inadeguatezza delle dosi impiegate; l'inefficacia di ZVAD-FMK alla concentrazione 20  $\mu\text{M}$  sugli oociti ci aveva indotto a testare anche un'altra concentrazione (100  $\mu\text{M}$ ), anch'essa risultata però inefficace. Un effetto positivo di ZVAD su alcuni parametri spermatici è stato evidenziato soprattutto quando l'inibitore è stato inserito nell'extender prima che il seme fosse sottoposto al congelamento. In particolare, infatti, il trattamento ha determinato un incremento significativo della motilità di massa post-scongelo, con una tendenza alla riduzione del tasso di frammentazione del DNA e all'aumento del potenziale di membrana mitocondriale, soprattutto con la concentrazione più elevata. Le poche differenze rilevate nei gruppi post-incubazione non sono invece, state di alcuna rilevanza biologica.

In conclusione, i risultati di questo studio hanno dimostrato che il trattamento degli spermatozoi con l'inibitore della caspasi Z-VAD-FMK potrebbe essere una strategia semplice ed economica per migliorare l'efficienza della crioconservazione degli embrioni bovini, fondamentale per una maggiore diffusione della tecnologia di produzione embrionale in vitro in campo. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per valutare la vitalità dell'embrione a lungo termine, valutando la loro capacità di impianto e di gravidanza dopo il trasferimento degli embrioni, prima di possibili applicazioni commerciali.



Al contrario, è stato dimostrato che la strategia di prevenire l'apoptosi indotta da crioconservazione con Z-VAD-FMK non è perseguibile per migliorare la criotolleranza di oociti e spermatozoi bovini, perché il trattamento, almeno alle dosi utilizzate, non ha influenzato affatto l'attività caspatica, né migliorato la resistenza dei gameti al congelamento. Ne consegue, tuttavia, la necessità di approfondire lo studio testando diverse concentrazioni dell'inibitore e tempi di esposizione prima di escluderne un potenziale utilizzo come "crioprotettore" per la crioconservazione dei gameti.

- Dalal J, Kumar A, Honparkhe M, Singh AK, Brar PS; 2018. Minimization of apoptosis-like changes developed during cryopreservation of buffalo bull sperm by supplementing Z-LEHD-FMK (Caspase inhibitor). *Int.J Curr.Microbiolog.App.Shi* 7(9):1076-1084.
- Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ; 2003. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology*. 47: 73-81.
- Peter AT, Colenbrander B, Gadella BM; 2005. Effect of caspase inhibitors on the post Fthaw motility, and integrity of acrosome and plasma membrane of cryopreserved equine spermatozoa. *Indian J Exp Biol*. 43:483 F7.
- Vallorani C, Spinacia M, Buccia D, Porcub E, Tamaninia C ,Galeatia G;2012. Pig oocyte vitrification by Cryotop method and the activation of the apoptotic cascade.