

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**  
**FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA**



**DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**PRODUZIONE E SANITÀ DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**  
**INDIRIZZO: SCIENZE DELL'ALLEVAMENTO ANIMALE**  
**XIX CICLO**

***Crioconservazione di embrioni di bufalo (*Bubalus  
bubalis*) prodotti in vitro mediante tecniche  
innovative di vitrificazione***

**Tutor:**

**Chiar.ma Prof.ssa Bianca Gasparrini**

**Candidata:**

**Dott.ssa Anna De Rosa**

**Coordinatore:**

**Chiar.ma Prof.ssa Maria Luisa Cortesi**

**NOVEMBRE 2006**

## INDICE

<b>INDICE</b>		pag. 2
<b>Capitolo 1</b>		
<b>Introduzione</b>		pag. 4
Le biotecnologie applicate alla riproduzione		pag. 4
Produzione embrionale in vitro		pag. 14
• Recupero degli oociti		pag. 14
• Maturazione in vitro		pag. 16
• Fecondazione in vitro		pag. 21
• Coltura in vitro		pag. 24
<b>Capitolo 2</b>		
<b>La crioconservazione</b>		pag. 31
Fisica della crioconservazione		pag. 36
Composizione dei media di congelamento		pag. 43
Danni e punti critici nei processi di congelamento		pag. 48
Principali tecniche di crioconservazione		pag. 53
Vitrificazione		pag. 60
Fattori che influenzano la sopravvivenza al congelamento		pag. 80
Influenza della specie e dello stadio di sviluppo sulla congelabilità embrionale		pag. 86
• Embrioni bovini		pag. 86
• Embrioni ovini e caprini		pag. 90
• Embrioni equini		pag. 91
• Embrioni suini		pag. 94
• Embrioni micromanipolati		pag. 97
• Embrioni bufalini		pag. 100
<b>Capitolo 3</b>		
<b>Parte sperimentale</b>		pag. 103
Scopo della tesi		pag. 103
Produzione embrionale in vitro: materiali e metodi		pag. 104
• Recupero degli oociti		pag. 104
• Maturazione in vitro		pag. 105
• Fecondazione in vitro		pag. 105
• Coltura in vitro		pag. 106
Esperimento 1: Vitrificazione di embrioni di bufalo mediante l'utilizzo delle tradizionali paillette da inseminazione		pag. 108

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esperimento 1.1: Effetto della vitrificazione in paillette sulla sopravvivenza embrionale in vitro</li> </ul>		pag. 109
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esperimento 1.2: Effetto della vitrificazione in paillette sulle percentuali di gravidanza dopo trasferimento in animali riceventi</li> </ul>		pag. 120
Esperimento 2: Vitrificazione di embrioni di bufalo mediante il metodo delle Open Pulled Straw (OPS)		pag. 126
Esperimento 3: Vitrificazione di embrioni di bufalo e di bovino mediante il metodo Cryotop		pag. 148
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esperimento 3.1: Vitrificazione di embrioni di bufalo mediante il metodo Cryotop</li> </ul>		pag. 150
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esperimento 3.2: Vitrificazione di embrioni di bovino mediante il metodo Cryotop</li> </ul>		pag. 164
<b>Capitolo 4</b>		
Discussione		pag. 171
Conclusione		pag. 192
Bibliografia		pag. 196

# **CAPITOLO 1**

## **INTRODUZIONE**

### **LE BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLA RIPRODUZIONE**

Le biotecnologie della riproduzione sono senza dubbio uno dei prodotti più emblematici di ricerca applicata nel campo delle scienze della vita e della zootecnia. Queste nuove tecnologie hanno contribuito in maniera decisiva all'evoluzione dell'allevamento negli ultimi 60 anni (Thibier M, 2005), consentendo di porre le basi per una radicale trasformazione della zootecnia e dei sistemi produttivi dei prossimi anni. Una delle caratteristiche fondamentali che un allevamento moderno deve possedere per poter essere competitivo sul mercato, è sicuramente quella di riuscire ad ottenere in tempi sempre più brevi un notevole miglioramento genetico senza però trascurare quelle che sono le esigenze del consumatore, sempre più sensibile alla qualità del prodotto e al benessere degli animali.

L'importanza fondamentale assunta dal miglioramento genetico, come mezzo per ammortizzare il costante aumento dei costi fissi di produzione, ha indotto molti ricercatori a focalizzare la propria

attenzione sulle biotecnologie riproduttive. A questo proposito sicuramente fondamentale risulta l'utilizzo di varie tecnologie quali: l'inseminazione strumentale (IS), la superovulazione (SO) e il trasferimento embrionale (ET), il sessaggio embrionale, la produzione embrionale in vitro (IVEP) e la crioconservazione delle cellule germinali (spermatozoi ed oociti) e degli embrioni; tutte queste tecniche, già utilizzate nella specie bovina, risultano però di difficile applicazione e diffusione nella specie bufalina, specie di interesse zootecnico fondamentale in quanto rappresenta una risorsa di grande valore economico nel Mezzogiorno d'Italia. In particolare, l'enorme impatto sull'economia di questa specie è dovuto alla produttività in termini di latte, che si è riusciti a migliorare sempre più nel corso degli anni, grazie ad interventi mirati a selezionare gli animali in base a questa caratteristica. Tutto ciò fa sì che la genetica della Bufala di razza Mediterranea Italiana sia la più richiesta nel mondo.

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 in oltre il 70% della popolazione bovina italiana. Proprio questi successi hanno spinto a credere che l'utilizzo dell'IS nell'ambito dei programmi di miglioramento genetico potesse dare degli ottimi risultati anche nella specie bufalina, in cui fino ad ora tali programmi sono stati concentrati prevalentemente ad ottenere risultati per via materna massimizzando la produzione di vitelli da soggetti ad elevata produzione.

Tutti i tentativi fino ad ora fatti hanno, però, evidenziato le numerose difficoltà che si incontrano quando si cerca di applicare tali tecniche, con le quali si sono ottenuti notevoli successi in altre specie (Samper J.C., 2001; Drost M. et al., 1999; Leboeuf B. et al., 1998; Singleton W.L., 2001), alla specie bufalina, la quale possiede caratteristiche fisiologiche che risultano profondamente diverse da quella bovina. Innanzitutto va puntualizzata la spiccata tendenza alla stagionalità riproduttiva della bufala, la quale tende, per la sua origine

tropicale, a concentrare i parti nei periodi dell'anno a giorno breve (fotoperiodo negativo); questa caratteristica si va a scontrare con quella che è la maggiore richiesta di latte sul mercato che si osserva nei periodi primaverili-estivi, che corrispondono a quelli di maggiore consumo del principale prodotto del latte di bufala: la mozzarella. La modificazione del calendario dei parti, attuata mediante la tecnica della destagionalizzazione, che consente di soddisfare le specifiche richieste di mercato, è, però, da considerarsi uno dei fattori che ha negativamente influito sulla fertilità della specie. Inoltre, va considerato che nella bufala il raggiungimento della pubertà è ritardato rispetto alla bovina e altre caratteristiche, quali l'ampia variabilità della durata delle manifestazioni estrali, l'alta incidenza di calori silenti, una lunga inattività ovarica post-partum ed il riscontro di doppie manifestazioni estrali, rendono gli interventi di IS difficilmente programmabili, anche quando si ricorre alla sincronizzazione dei calori (Zicarelli L., 2002). Da tutto questo si può quindi evincere quanto la bufala si differenzi dalla bovina e quanto invece sia simile in molti aspetti agli ovi-caprini. Tutto ciò, insieme all'aumento dei costi di produzione, non ha fatto altro che spingere molti ricercatori a cercare di sfruttare le biotecnologie in campo riproduttivo per accelerare il miglioramento genetico della specie bufalina, rendendola così competitiva sul mercato.

Tra le varie tecnologie finora citate quelle che meglio si prestano ad ottenere in tempi brevi un rapido miglioramento genetico e ad esaltarne il contributo materno, sono sicuramente la SO e l' ET o MOET (Multiple Ovulations and Embryo Transfer). 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% sono stati congelati/scongelati e il 18% sono stati prodotti in vitro (Thibier M., 2004).

La SO 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 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. In prossimità dell'ovulazione gli animali trattati vengono inseminati e dopo 6-7 giorni, mediante flushing (lavaggio 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. 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. Diverse esperienze hanno dimostrato, però, che

esistono forti limitazioni all'utilizzo dei programmi di MOET nella bufala, specie in cui il recupero medio di embrioni è molto inferiore a quello che si osserva nella specie bovina: meno di 2 embrioni nella bufala (Zicarelli L., 2001) e tra 7 e 10 nella bovina a seconda della razza e del trattamento di SO impiegato (Halser J.F. et al., 2003; Baruselli P.S. et al., 2006). Da questi valori si può, quindi, chiaramente evidenziare quanto sia bassa nella bufala la risposta alla SO (Misra AK., 1997; Zicarelli L., 1997); infatti, mentre nella bovina l'88 % degli animali risponde ai trattamenti, nella bufala questo valore scende al 55 %. Il minore recupero è dovuto alle caratteristiche fisiologiche intrinseche di questa specie quali ad esempio l'esigua popolazione di follicoli primordiali presenti nell'ovaio alla nascita, 20.000 vs 100.000 della vacca. (Samad H.A., Nasser A.A., 1979; Danell B., 1987; Le Van TY et al., 1989). e la scadente qualità degli oociti, nella bufala; infatti, rispetto alla vacca, si osserva una più bassa incidenza di oociti di buona qualità (Boni R. et al., 1996) ed una minore adesione delle cellule della granulosa. Ci sono, comunque, molti casi in cui al momento del flushing si osservano vari corpi lutei (CL), ma il numero di embrioni recuperato risulta inferiore al numero di CL.

L'impossibilità di ottenere buoni risultati, o quantomeno paragonabili a quelli avuti in altre specie, ha evidenziato negli ultimi

anni una notevole crescita d'interesse verso l'IVEP. Un fattore che ha sicuramente contribuito a considerare quest'ultima come una valida alternativa alla produzione embrionale in vivo è l'avvento della metodica dell'Ovum Pick Up (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 degli oociti, una di fecondazione e la successiva messa in coltura dei presunti zigoti fino allo stadio di blastocisti, stadio in cui gli embrioni possono essere trasferiti (ET) o sottoposti a sessaggio e/o congelamento. Questa tecnica, applicata per la prima volta in campo umano (Lenz S. et al., 1987) è stata utilizzata nel bufalo da Boni et al. (1993) e da Galli et al. (1998); questi ultimi hanno, così, ottenuto i primi 3 vitelli bufalini nati dal trasferimento di embrioni prodotti da oociti recuperati con l'OPU, maturati e fecondati in vitro e trasferiti in ovidutto di pecora dopo due giorni dalla fecondazione.

I vantaggi nell'utilizzo della tecnica OPU sono dovuti alle sue maggiori possibilità di impiego, ovvero nei casi in cui la tecnica della SO non è applicabile, come ad esempio nei soggetti in non perfette condizioni sanitarie del tratto genitale, gravidi fino al 4° mese, aciclici e prepuberi; in più è una tecnica che non interferisce con lo stato

fisiologico della donatrice, in quanto non necessita di una stimolazione ormonale, è facilmente eseguibile, ripetibile, non incide negativamente sulla sfera riproduttiva dell'animale e consente di visualizzare e, quindi, pungere, tutti i follicoli ecograficamente visibili, a partire dal diametro di 2 mm (Janssen-Caspers H.A.B. et al., 1988). Un altro vantaggio è rappresentato dal fatto che ad ogni aspirazione dei follicoli, si ottiene un azzeramento del ciclo, che consente lo sviluppo di una nuova ondata, evitando così il fenomeno della dominanza di un follicolo sugli altri che comporterebbe l'atresia dei follicoli subordinati. Le ondate follicolari, perciò, passano da 2-3 per ciclo estrale a 6 nello stesso periodo di tempo, esitando nella produzione di un maggiore numero di oociti utilizzabili ai fini della produzione embrionale in vitro. Questo fa sì che l'OPU possa essere ripetuto bisettimanalmente ottenendo il massimo recupero di oociti e migliorandone, tra l'altro, anche la qualità. I dati più recenti in termini di percentuali di embrioni prodotti in vitro da oociti prelevati mediante OPU, ripetuto ogni 3-4 giorni, hanno mostrato un notevole miglioramento (Neglia et al., 2003) rispetto ai dati precedenti (Boni et al., 1993). E' stato dimostrato che l'efficienza IVEP migliora quando vengono utilizzati oociti prelevati mediante OPU rispetto a quelli ottenuti da ovaie da macello (29.7 vs 19.9 % di BI rispettivamente; Neglia et al., 2003). Questa tecnica risulta competitiva rispetto alla MOET particolarmente nella specie

bufalina. Infatti, se da un lato per ogni OPU effettuato si producono in media nella bovina 0.8 e nella bufala 0.2 embrioni da donatrici adulte rispetto ai 4.4 ed 1.7 ottenibili nell'ambito di un programma di SO-ET (Zicarelli 2001), dall'altro, quest'ultimo non può essere ripetuto prima che siano trascorsi almeno 75 giorni per la bovina e 100 per la bufala. Ovviamente, non va dimenticato che sebbene l'efficienza di recupero nella bufala sia simile a quella che si riscontra nella bovina, il numero di oociti recuperati risulta nettamente inferiore per la diversa entità della popolazione follicolare che contraddistingue le due specie. Conseguentemente, con l'OPU la produzione media di embrioni prodotti ad esempio nell'arco di sei mesi aumenta significativamente (41 vs 15 nella bovina e 11 vs 5 nella bufala, rispettivamente con le tecniche OPU e SO). Inoltre, se si considera che la bufala è una specie stagionale, è estremamente improbabile che l'animale possa rimanere ciclico per 6 mesi consecutivi e che quindi si possa raggiungere il numero di 5 embrioni prodotti con la SO, dato che diventa così puramente teorico, avvalorando ancora di più i risultati ottenuti con l'utilizzo della tecnica dell'Ovum Pick Up. In più, va sottolineato che esiste un'elevata variabilità individuale nel reclutamento follicolare e che la ripetibilità di tale parametro consente di poter effettuare una selezione delle migliori donatrici sulla base dei primi 4 prelievi OPU (Gasparri B. et al., 2002), rendendo la tecnica maggiormente

competitiva in termini di resa embrionale; la tecnica OPU, quindi, apre nuove prospettive consentendo di incrementare ulteriormente l'efficienza riproduttiva della specie. Inoltre, 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'ulteriore accelerazione del progresso genetico.

Sebbene con la produzione embrionale in vitro si siano ottenuti embrioni bufalini trasferibili (Boni et al., 1994a; Boni et al., 1999; Chauhan et al., 1997a; Gasparrini et al., 2000; Madan et al., 1994a; Madan et al., 1994b; Totey et al., 1992) ed alcuni trasferimenti di embrioni prodotti in vitro siano stati coronati da successo (Chauhan et al., 1997a; Madan et al., 1994b; Totey et al., 1996b), i risultati in termini di gravidanze portate a termine sono ancora poco soddisfacenti (Madan et al., 1996). Probabilmente, questa minore efficienza è imputabile al fatto che tale sistema è stato sviluppato sulla base di esperienze acquisite in altre specie facendo particolare riferimento alla specie bovina, mentre è verosimile che la fisiologia, il metabolismo e le esigenze di coltura dei gameti e degli embrioni bufalini siano differenti da quelli bovini e richiedano maggiori approfondimenti.

A questo proposito risulta quindi fondamentale trattare, se pure in linea generale, i differenti momenti che caratterizzano l'IVEP nella specie bufalina.

## **Produzione embrionale in vitro**

Il sistema di produzione embrionale in vitro è diviso in varie fasi:

1. recupero degli oociti;
2. maturazione in vitro (IVM);
3. fecondazione in vitro (IVF);
4. coltura in vitro (IVC).

### ***1. Recupero degli oociti***

Uno dei fattori che influisce negativamente sulla produzione embrionale in vitro è la scarsa reperibilità di materiale sperimentale. 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 bisettimanalmente 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. Già da questa prima fase è possibile evidenziare le prime fondamentali differenze tra la specie bufalina e quella bovina; infatti, mentre in

quest'ultima si recuperano 10 complessi cumulo-ocita (COCs) di buona qualità per ovaio, nella bufala il recupero medio scende drasticamente a 2,4/ovaio (Gasparrini B. et al., 2000). In realtà, questa differenza è abbastanza prevedibile se si tiene conto delle caratteristiche fisiologiche della bufala quali: il più basso numero di follicoli primordiali presenti nell'ovaio della bufala rispetto alla bovina, il ridotto numero di follicoli antrali durante tutti gli stadi del ciclo estrale (Kumar A. et al., 1997), l'elevata incidenza di atresia follicolare che in ovaie da macello oscilla tra l'82 % (Ocampo MB, et al. 1994) e il 92 % (Palta P. et al. 1998), le stesse dimensioni della gonade della bufala. Infine, è necessario evidenziare che, rispetto alla bovina, la bufala viene di solito macellata alla fine della carriera produttiva, quando la fertilità è notevolmente ridotta e il numero di follicoli è drasticamente calato. Alla luce di tutto ciò al fine di ottenere il maggior numero possibile di oociti, sono stati utilizzati diversi metodi per il recupero, tra cui lo "slicing" e l'aspirazione follicolare (Boni R. 1994; Boni R. et al., 1994b); è quest'ultima, però, quella che viene maggiormente impiegata nella pratica di laboratorio. L'aspirazione dei follicoli viene quindi effettuata con un ago collegato ad una pompa da vuoto al fine di mantenere costante la pressione e di evitare un eccessivo dispendio di tempo che potrebbe compromettere la vitalità degli oociti.

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:

GRADO A: oociti con citoplasma omogeneo e ricoperti per l'intera superficie da diversi strati di cellule del cumulo;

GRADO B: oociti con citoplasma omogeneo e circondati per almeno il 70 % della superficie da più strati di cellule del cumulo;

GRADO C: oociti con poche cellule del cumulo, o completamente nudi;

GRADO D: oociti degenerati;

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

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. Generalmente, gli oociti di grado A e B sono quelli scelti per la successiva fase di IVEP.

## ***2.Maturazione in vitro***

Un adeguato sistema di maturazione in vitro è di fondamentale importanza ai fini della produzione embrionale in vitro.

A questo proposito risulta, dunque, essenziale l'utilizzo, in questa fase, di specifici terreni di coltura che consentano di ottenere in vitro una corretta maturazione nucleare e citoplasmatica degli oociti immaturi prelevati sia mediante OPU, sia per aspirazione follicolare da ovaie da macello.

Per meglio comprendere l'importanza di questa fase è opportuno 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 all'LH dipende dalle dimensioni del follicolo. Infatti, in quelli con diametro inferiore a 8mm, le cellule della granulosa non sembrano possedere i recettori per LH; al contrario, nei follicoli con diametro superiore a 8mm, 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'ocita, 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 R. et al., 1992; Neglia G. 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 questo proposito è stato fondamentale stabilire il tempo di permanenza degli oociti nel terreno di maturazione, e quale fosse la più corretta composizione di questi media affinché si raggiungesse una buona percentuale di avvenuta maturazione. Per quanto riguarda il tempo di IVM, gli studi fino ad ora eseguiti mostrano dati discrepanti tra loro: nel bufalo è stato osservato che la maggiore percentuale di maturazione si raggiunge dopo 24h di incubazione (Yadav BR. et al. 1997), ma studi più recenti sul bufalo (Neglia G. et al., 2001) hanno evidenziato una maggiore percentuale di oociti in MII già a partire dalle 15 ore, quindi un tempo più breve rispetto alla specie bovina.

Numerosi terreni complessi sono stati utilizzati nelle procedure di IVM: TCM 199 (Madan et al. 1994a), l'Ham's F-10 (Totey et al. 1993b ) e il Waymouth (Ravindranatha et al. 2001).

Ognuno di questi terreni necessita dell'aggiunta di siero, supplemento fondamentale che rende i media più idonei alla

maturazione oocitaria in quanto apporta proteine e fattori di crescita e previene l'indurimento della zona pellucida che altrimenti ostacolerebbe la fertilizzazione. Diversi sono stati gli esperimenti fatti per stabilire quali fossero i sieri da usare e in quali concentrazioni, come ad esempio il siero fetale di vitello (FCS; Totey et al., 1992; Totey et al., 1993a; Totey et al., 1993b), quello fetale bovino (FBS; Chauhan et al., 1997c; Chauhan et al., 1998a), il siero di bufala in estro (EBS; Totey et al., 1992; Madan et al., 1994b; Chauhan et al., 1998a), il siero di bufala in pre-estrogeno (pro-EBS; Samad et al., 1998), quello di vacca in calore (ECS; Samad et al., 1998), il siero umano (Chuangsoongneon U. e Kamonpatana M., 1991) e il siero di bufala superovulata (SBS, Chauhan et al., 1998a). In realtà non è stata riscontrata nessuna differenza in termini di espansione del cumulo, maturazione nucleare, e capacità di sviluppo fino allo stadio di blastocisti con l'aggiunta dei diversi sieri, ma tuttavia, se pure più costoso, l'FCS di derivazione commerciale può contribuire a standardizzare quanto più possibile il sistema di IVM.

Sebbene la maturazione degli oociti in vitro possa essere ottenuta anche senza l'aggiunta di ormoni (Madan ML. Et al., 1994a;1994b), la loro presenza (gonadotropine e estradiolo) nei media di IVM consente sia una più idonea maturazione che una migliore fertilizzazione (Totey SM. Et al., 1992; 1993a).

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 riveste, sia in vivo che in vitro, un importante ruolo protettivo nei confronti dello stress ossidativo, uno dei maggiori fattori che influenzano negativamente lo sviluppo di embrioni di mammifero. Sulla base di precedenti esperienze con embrioni bovini e ovini (de Matos DG. Et al., 1996; 2000), Gasparrini et al. (Gasparrini et al; 2000) hanno dimostrato che l'aggiunta di 50  $\mu$ M di cisteamina al medium di maturazione può incrementare l'efficienza IVEP anche nella specie bufalina aumentando la percentuale di embrioni e migliorandone la qualità, grazie alla stimolazione della sintesi oocitaria di GSH.

### ***3.Fecondazione in vitro***

Questa fase dell'IVEP, soprattutto nel bufalo, risulta molto importante e data la sua bassa efficienza rispetto a quella riscontrata nella specie bovina (percentuale di B1 sul totale degli oociti messi in maturazione: 20 vs 30 % rispettivamente nella bufala e nella bovina), è stata ed è tutt'ora oggetto di numerosi studi. Molto probabilmente uno dei motivi della scarsa efficienza dell'IVEP nella specie bufalina è proprio rappresentato dal cleavage (divisione cellulare dopo fecondazione) che infatti risulta significativamente più basso rispetto al bovino (65 % vs 84 %) nonostante la percentuale di oociti in MII dopo

la IVM sia simile in entrambe le specie (87 % vs 94 %, per bufalo e bovino rispettivamente); inoltre, il fatto che la resa embrionale, ottenibile dagli oociti divisi, non differisce tra le due specie, suggerisce che l'IVF rappresenta una fase critica.

Di certo la qualità del seme bufalino usato per la fecondazione è un grosso limite; infatti, visto che si utilizza seme congelato, i primi problemi sono rappresentati dai danni da congelamento ampiamente dimostrati (Meur S. et al., 1988). Altro fattore da considerare è la capacitazione del seme di bufalo, per la quale finora solo l'utilizzo di eparina ha consentito di ottenere dei buoni risultati. Controversi sono i dati in merito alle modalità di utilizzo dell'eparina: secondo alcuni autori (Chauhan MS. et al., 1997d) è necessario un pretrattamento del seme, in medium contenente eparina, di diverse ore; per altri (Boni R. et al., 1994b; Bacci ML. Et al., 1991) invece, pochi minuti di esposizione garantirebbero una buona capacitazione; altri ancora sostengono, invece, che l'eparina può anche essere aggiunta nel terreno stesso di fecondazione (Totey SM. Et al., 1992; Gasparrini B. et al., 2000).

Altra caratteristica importante, di cui tener conto, è la motilità del seme congelato, che a questo scopo può essere selezionato mediante "swim-up" (Chuangsoongneon e Kamonpatana, 1991; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997a; Chauhan et al., 1997b; Nandi et al.,

1998; Boni et al., 1994; Bacci et al., 1991; Boni R., 1994; Neglia et al., 2001), o percoll (Boni R. et al., 1999; Totey et al., 1993b; Totey et al., 1993a; Gasparrini et al., 2000). Inoltre per migliorare la motilità e la capacità fecondante sono stati aggiunti diverse sostanze (caffeina, penicillamina, ipotaurina, epinefrina, etc.) (Totey et al., 1992; Madan et al., 1994b; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c; Bacci et al., 1991; Madan et al., 1994b; Totey et al., 1993a; Totey et al., 1996). Per quanto riguarda i media di IVF quelli più usati sono il “Tyrode’s modified medium” (TALP; Totey et al., 1992; Madan et al., 1994a e b; Totey et al., 1996; Gasparrini et al., 2000; Boni et al., 1994) o il “Brackett and Olifant” (BO; Totey et al., 1992; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c; Nandi et al., 1998; Bacci et al., 1991).

Altri fattori importanti per questa fase dell’IVF sono la concentrazione spermatica e la proporzione oociti-spermatozoi; anche in questo caso ci sono stati numerosi studi a riguardo, i cui risultati erano spesso in contrasto tra loro (Bacci et al., 1991; Totey et al., 1993a; Nandi et al., 1998). Comunque dai risultati ottenuti nel nostro laboratorio, l’utilizzo di TALP con aggiunta di eparina, penicillamina ed ipotaurina, l’impiego della tecnica dello swim-up e una concentrazione di  $2 \times 10^6$  spermatozoi/ml sono in grado di dare discreti risultati (65% cleavage).

Infine 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.

#### ***4.Coltura in vitro***

Sono diverse le tappe fondamentali che hanno caratterizzato la ricerca di un idoneo sistema di coltura in vitro per gli embrioni bufali.

Sicuramente il sistema di co-coltura con diversi tipi cellulari ha dato il via ad una serie di tentativi che però hanno sempre dato una bassa percentuale di blastocisti (Totey et al., 1992; Madan et al., 1994a; Jainudeen et al., 1993); i primi miglioramenti sono stati osservati con l'utilizzo di monostrati di cellule del cumulo in presenza di cellule oviduttali (Madan et al., 1994a) ed è stato ipotizzato che un tale aumento dell'efficienza fosse dovuto alla capacità delle cellule oviduttali di secernere fattori embriotrofici.

Ulteriori successi si sono avuti con l'impiego di monostrati di cellule di fegato di Ratto Bufalino (BRL) in TCM 199 con 10% di Siero Fetale Bovino (FCS) o di cellule renali di scimmia (VERO) (Boni et al., 1994b; Boni et al., 1999); in questi casi, però, non si è riusciti a stabilire con esattezza quali fossero i fattori specifici che avessero

portato a quei risultati; molto probabilmente le cellule somatiche, oltre a secernere fattori embriotrofici, come era stato già evidenziato con le cellule oviduttali, sono in grado di rimuovere componenti potenzialmente nocivi e modificare la concentrazione delle varie sostanze presenti nel terreno di coltura in modo che raggiungano livelli più idonei allo sviluppo embrionale.

Uno dei momenti più importanti è stato indubbiamente quando Tervit et al. (1972) misero a punto il “Synthetic oviductal fluid” (SOF) che ha consentito di ottenere numerosi successi nella coltura in vitro di embrioni bovini ed ovini. Nel 1999 Boni et al. hanno utilizzato il SOF con l’aggiunta di amminoacidi essenziali e non e di albumina sierica bovina (BSA) migliorando le percentuali di blastocisti rispetto all’impiego di coculture; inoltre da questo esperimento è emerso che embrioni coltivati in SOF sembrano morfologicamente migliori, più compatti e in grado di svilupparsi più velocemente. Proprio la velocità di sviluppo può essere presa come parametro di riferimento per la qualità d’embrioni prodotti in vitro; Totey et al. (1996) hanno dimostrato l’esistenza di una diretta correlazione tra l’efficienza della produzione embrionale e la velocità di sviluppo degli embrioni, e che embrioni precoci hanno normalmente un numero di cellule maggiore.

Altro segno di buona qualità è dato dalla capacità degli embrioni di rompere la zona pellucida e di sgusciare al di fuori di essa; più precoce

è il manifestarsi di questo fenomeno migliore è la qualità degli embrioni bufalini prodotti in vitro. Infatti in un buon sistema di IVEP si possono osservare blastocisti sgusciate già a sei giorni dalla fecondazione (giorno di IVF = giorno 0) e la valutazione della percentuale finale di embrioni prodotti non dovrebbe essere oltre il giorno 7; difatti è stato provato che embrioni che si sviluppano lentamente sono anche meno vitali. Tutto ciò corrisponde anche a quello che accade in vivo in cui la maggior parte degli embrioni recuperati attraverso lavaggi uterini sono allo stadio di blastocisti sgusciate al giorno 5 (Karaivanov et al., 1987), 6.5 (Drost e Elsdén, 1985), 6 (Zicarelli et al., 1993) e 7 (Chantaraprateep et al., 1989) post inseminazione. Quindi si può affermare che gli embrioni bufalini anticipano lo sviluppo, sia in vitro che in vivo, rispetto a quelli bovini (Jian et al. 1998) di circa un giorno.

Negli ultimi anni sono stati sperimentati nell'uomo e nel bovino nuovi sistemi di coltura embrionale in vitro utilizzando terreni definiti sequenziali (Gardner e Lane 1998). La caratteristica di questi nuovi sistemi sta nella possibilità di cambiare alcuni dei componenti del medium di coltura a seconda dello stadio di sviluppo embrionale, in modo da rispondere alle esigenze metaboliche degli embrioni che variano man mano che si procede dalle prime fasi di divisione al raggiungimento dello stadio di blastocisti. Visti gli incoraggianti

risultati ottenuti in altre specie, l'utilizzo di questi stessi terreni con una composizione differenziata a seconda del periodo della coltura embrionale potrebbe, quindi, contribuire al miglioramento dell'efficienza dell'IVEP anche in campo bufalino.

La possibilità, quindi, di potenziare gli attuali sistemi di IVEP, con il conseguente ottenimento di embrioni di migliore qualità, potrebbe anche consentire di incrementare l'efficienza delle tecniche di crioconservazione embrionale; infatti è noto che un requisito fondamentale, affinché tali procedure abbiano successo, è proprio la buona qualità degli embrioni, caratteristica richiesta sia nel caso di embrioni prodotti in vitro che in vivo. 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 IVEP.

In generale, la tecnica di crioconservazione, grazie alla possibilità di poter conservare per tempi praticamente illimitati sia cellule germinali che embrioni, può essere considerata un ottimo strumento per accelerare la diffusione in campo delle biotecnologie riproduttive. Uno degli esempi che si possono riportare a riguardo è sicuramente l'enorme impulso che la crioconservazione di seme nella specie bovina ha dato alla diffusione dell'IS, che, come già detto in precedenza, viene oggi messa in pratica di routine nella maggior parte delle aziende

bovine. I vantaggi dell'inseminazione strumentale con seme congelato sono molteplici: facile accessibilità al seme che consente di sfruttare al meglio materiale genetico maschile senza dover tener conto della localizzazione del toro; facile commerciabilità del seme in quanto più semplice da trasportare, calcolando che il costo del trasporto di un animale è considerevolmente superiore ed è inoltre comporta un notevole stress che è noto influire negativamente sulla sfera riproduttiva; ancora, la possibilità di consentire una maggiore diffusione delle procedure di IVF in riproduzione assistita, come ad esempio in campo umano o anche nel caso di specie in via di estinzione o in laboratori dove si lavora con animali transgenici.

Per quanto riguarda invece la crioconservazione degli oociti, basti pensare ai vantaggi di poter disporre di una illimitata quantità di materiale che potrebbe essere usato per migliorare lo sviluppo delle tecniche di IVF, di coltura embrionale e di altre metodologie di micromanipolazione cellulare, dove la disponibilità continua di oociti competenti e vitali risulta necessaria. Inoltre, se si tiene conto della breve vita fertile degli oociti di mammifero e dei limiti che da essa derivano, si comprende quanto importante possa essere mettere a punto un metodo efficace di crioconservazione delle cellule germinali della linea femminile. Ciò, ad esempio, permetterebbe a molte donne che, per diversi motivi hanno perso la funzionalità delle gonadi, di

ristabilire l'attività riproduttiva, evitando i problemi etici e legali legati alla crioconservazione embrionale. La crioconservazione permetterebbe di preservare gli oociti di animali domestici e da laboratorio per fini di ricerca o per applicazioni commerciali che vanno dalle semplici prove di penetrazione spermatica alle tecniche più complicate di clonazione ed ingegneria genetica.

La possibilità di crioconservare gli embrioni ha contribuito, in misura rilevante, alla diffusione in campo della tecnologia dell'ET, sia nella specie bovina che in altre specie domestiche. La possibilità di conservare embrioni per tempi pressoché illimitati, infatti, rappresenta un valido strumento per ovviare alle problematiche che maggiormente ostacolano l'applicazione commerciale delle procedure di ET, quali la necessità di pianificare gli interventi di trasferimento embrionale, in modo da ridurre i costi, e la scarsa disponibilità di animali riceventi. Quest'ultima rappresenta una delle principali ragioni di insuccesso dell'ET nella specie bufalina, specie in cui si registra una minore responsività alla stimolazione ormonale e, quindi, alla sincronizzazione. Inoltre, la crioconservazione embrionale può essere considerata particolarmente importante in questa specie, e in altre specie stagionali, in cui il successo, sia dell'IS che della IVEP, è strettamente dipendente dalla stagione riproduttiva, in quanto i migliori risultati si ottengono, infatti, nella bufala quando tali interventi vengono eseguiti

nel periodo più favorevole alla sua attività riproduttiva. Infine, la crioconservazione e lo sviluppo di tecniche sempre più idonee alla crioconservazione a basse temperature risulta essere il migliore strumento per cercare di sfruttare tutti gli embrioni prodotti da animali di alto valore genetico.

## **CAPITOLO 2**

### **LA CRIOCONSERVAZIONE**

La tecnologia della crioconservazione è in grado di interferire con la fisiologia cellulare e di arrestare il tempo biologico. Quando una cellula viene congelata e stoccata a temperature di  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , che corrisponde alla temperatura dell'azoto liquido ( $\text{LN}_2$ ), i processi metabolici sono bloccati e la vitalità cellulare è praticamente indipendente dal tempo di conservazione; infatti, spermatozoi bovini crioconservati per più di 50 anni non hanno mostrato una significativa riduzione della vitalità, né alterazioni di tipo mutagenico come dimostrato da uno studio in cui l'incidenza di tali anomalie non è risultata diversa in animali prodotti con l'uso di seme congelato rispetto al fresco (Elder K. e Brian D. 2000). La temperatura dell'azoto liquido è quella che viene considerata più idonea allo stoccaggio di materiale biologico congelato in quanto studi in questo senso hanno dimostrato che a temperature inferiori a  $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$  la vitalità cellulare decresce per conservazioni a lungo termine. Per questo motivo l'uso di queste temperature di conservazione più alte viene preso in considerazione per lo stoccaggio di sospensioni microbiche o di colture di tessuti di mammifero, dove una parziale riduzione della vitalità può

essere accettabile in quanto si ha a che fare con un elevato numero di cellule congelate, ma tale approccio risulta invece inappropriato per la crioconservazione di embrioni, oociti e spermatozoi.

Dopo il congelamento molto importante risulta una corretta conservazione del materiale con un idoneo mantenimento della catena del freddo. Visti i costi e le difficoltà, però, si è anche cercato di sperimentare nuove metodiche per la conservazione come, ad esempio, la liofilizzazione del materiale biologico, che sotto questa forma risulterebbe più facile da conservare. A questo scopo spermatozoi liofilizzati di topo sono stati iniettati direttamente in oociti dando come risultato un normale sviluppo (Wakayama T. e Yanagimachi R. 1998), ma studi più approfonditi con lieviti e batteri hanno evidenziato un'alta incidenza di mutagenesi (Elder K. e Brian D. 2000) e, con il progredire del tempo di conservazione, anche una diminuita vitalità, ostacolando così l'uso di seme liofilizzato.

I primi esperimenti di crioconservazione risalgono al 1776, quando venne dimostrato che, esponendo spermatozoi umani a basse temperature, si riusciva a conservarne la motilità (Doetsch, 1976). L'utilizzo dei primi crioprotettori come il glicerolo risale alla metà del secolo scorso, quando questo venne utilizzato per crioconservare seme di pollo (Polge C. et al., 1949). Solo pochi anni dopo, nel 1953, si ottenne un normale sviluppo embrionale a termine dopo la

fecondazione di oociti con l'utilizzo di seme umano congelato, su ghiaccio secco, e scongelato (Sherman JK. e Bunge RG. 1953). Nel 1964 Perloff et al. ottennero la prima gravidanza da seme umano congelato utilizzando glicerolo come crioprotettore e vapori di azoto liquido.

Nonostante i primi esperimenti di congelamento di oociti risalgano alla metà del secolo scorso, ancora oggi non si è riusciti ad individuare un metodo efficace per la crioconservazione di oociti umani e di animali domestici. Nel 1957, si dimostrò che oociti di topo erano in grado di sopravvivere al congelamento a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  in un medium contenente il 5 % di glicerolo (Lin TP. et al., 1957). La nascita di un topolino dalla fecondazione in vitro di oociti previamente congelati a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  in un medium contenente il 5 % di glicerolo risale invece al 1958, stesso esperimento in cui è risultata letale per gli oociti, invece, l'esposizione a temperature di  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Sherman JK. e Lin TP. 1958).

Per quanto riguarda gli embrioni, i primi esperimenti di crioconservazione coronati da successo sono stati effettuati in campo umano (Van der Elst J. et al., 1997).

Nel 1972 Whittingham et al. sono riusciti ad ottenere la nascita del primo topolino dopo crioconservazione di embrioni di topo con l'applicazione di modelli matematici. Lo stesso autore, nel 1977, ha riportato anche il primo successo di crioconservazione di oociti di topo

a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La prima gravidanza da embrioni bovini congelati e scongelati risale, invece, al 1973 (Wilmot I. e Rowson LEA. 1973). Questi primi studi hanno evidenziato che il congelamento di embrioni bovini a temperature al di sotto dello zero ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) richiedeva uno scongelamento lento. Successivamente è emerso che il congelamento lento poteva essere interrotto a temperature sotto zero relativamente alte (tra  $-25$  e  $-35^{\circ}\text{C}$ ) per poi immergere il campione direttamente in  $\text{LN}_2$ , ma in questo caso era necessario uno scongelamento rapido. Tali scoperte, sviluppate da Willadsen e Cambridge per congelare embrioni di pecora (Willadsen 1977), hanno poi gettato le basi delle tecniche di crioconservazione largamente usate in commercio. I primi esperimenti con la tecnica della vitrificazione risalgono, invece, al 1985, quando Rall e Fahy (Rall WF. e Fahy GM. 1985) applicarono questa tecnica per la prima volta ad embrioni di topo; mentre la prima gravidanza, ottenuta dal trasferimento di embrioni bovini vitrificati, è stata riportata da Massip et al. nel 1986.

Da allora molti esperimenti e notevoli miglioramenti si sono ottenuti nel campo della crioconservazione embrionale grazie ai quali, negli ultimi anni, sono stati crioconservati con successo embrioni della maggior parte delle specie domestiche ed in particolare di bovino (Lazar L. et al. 2000; Zhang L. et al., 1993), pecora (Ptak G. et al., 1999; Dattena M. et al., 2000), capra (Baril G. et al., 1989; El Gayar M. e

Holtz W. 2001; Traldi, AS. 2000), cavallo (Hochi S. et al., 1994), e maiale (Hayashi S. et al., 1989; Berthelot F. et al., 2000).

## ***Fisica della crioconservazione***

Nei processi di crioconservazione gli oociti e gli embrioni di mammifero vengono sottoposti a temperature sottozero, e cioè ad una condizione non-fisiologica; di conseguenza il meccanismo di difesa che riescono a mettere in atto in tali condizioni è inappropriato e necessita di un aiuto esterno. Inoltre, se si pensa che l'acqua allo stato liquido è un elemento essenziale alla struttura e alla funzione delle cellule viventi, non è una sorpresa che la sua solidificazione dopo il congelamento risulta di solito letale. Ciononostante, il congelamento per preservare le cellule in uno stato vitale per lunghi periodi di tempo è possibile. Questo processo è in grado di rallentare o arrestare alcune reazioni biochimiche, ma anche di accelerarne delle altre.

Il principale pericolo per le cellule durante i processi di congelamento è rappresentato non dallo stoccaggio a temperature molto basse, ma dall'attraversamento della cosiddetta zona intermedia di temperatura critica (tra +15 °C e -5 °C ) che si verifica sia durante la fase di raffreddamento, che durante quella di riscaldamento (Dobrinisky 1996, Martino et al., 1996a, b, Isachenko et al., 1998, Zeron et al., 1999).

A  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  le reazioni chimiche non possono avere luogo, vista l'insufficiente energia termica che si ha a queste temperature. Ciò è dovuto al fatto che l'acqua, al di sotto di  $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ , non esiste allo stato liquido, ma solo allo stato cristallino o vitreo, stati in cui la viscosità è talmente alta da limitare fortemente la diffusione delle molecole.

Tenendo conto della fondamentale funzione dell'acqua e dei cambiamenti di stato che essa subisce durante il processo di crioconservazione, responsabili dei danni letali che si verificano nelle cellule, è opportuno introdurre alcuni importanti concetti.

Uno di questi è sicuramente il superaffreddamento. Con questo termine si intende 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 (ghiaccio). In questa situazione, toccare la soluzione acquosa o l'acqua con un cristallo o con un oggetto metallico induce la sua cristallizzazione e la temperatura ritorna immediatamente al punto di congelamento. Questo processo viene anche definito "seeding", e viene generalmente usato per ottenere un congelamento controllato manualmente. La cristallizzazione può essere indotta dalle particelle presenti nel medium o dalla vibrazione meccanica di superfici. Questo è un fenomeno che si verifica normalmente 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 °C, la sua formazione può avvenire a temperatura ben al di sotto dello zero, e in condizioni molto controllate, l'acqua può addirittura essere raffreddata fino a -40°C prima che abbia inizio l'enucleazione del ghiaccio. Innescato il processo di formazione del ghiaccio, la temperatura risale di nuovo 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 svariati fattori, quali la temperatura, la velocità di congelamento, il volume, la purezza delle particelle ecc.; questo fenomeno del superaffreddamento, nei processi di crioconservazione delle cellule e dei tessuti riproduttivi, si verifica molto spesso.

Di conseguenza risulta molto importante poter effettuare il *seeding* quando si congelano le cellule ed, in particolare, gli embrioni; in questo modo si cerca di evitare tutti quegli effetti dannosi dovuti al superaffreddamento. Infatti, in diversi esperimenti (Mazur P. 1984), è stato dimostrato che la formazione controllata del ghiaccio rappresenta un fattore chiave per la vitalità degli embrioni dopo congelamento/scongelo in quanto campioni che venivano

enucleati ad una temperatura inferiore a  $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$  erano meno vitali di quelli in cui l'enucleazione veniva effettuata a temperature di  $-5$  e  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Per questo motivo, durante il congelamento lento, le paillette sono solitamente raffreddate fino alla temperatura di  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura che viene mantenuta fino al raggiungimento dell'equilibrio termico, e successivamente, toccando esternamente la paillette, ad esempio, con delle pinze raffreddate in azoto liquido, si induce la formazione di 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  $2.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  a  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Questo processo consente di ottenere la disidratazione cellulare, fondamentale per minimizzare i danni da freddo che dipendono dalla formazione dei cristalli di ghiaccio.

Da quanto precedentemente detto, il fenomeno del superaffreddamento fa sì che, fino alla temperatura di  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sia le cellule che il medium che le circonda non congelano, questo grazie anche alla presenza in quest'ultimo di soluti protettivi (crioprotettori) che abbassano il punto di fusione. È infatti solo al di sotto dei  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  che 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.

Affinché la dinamica del congelamento segua questo iter durante le procedure di congelamento, le cellule sono esposte a soluzioni ipertoniche crescenti, per facilitare la fuoriuscita di acqua dall'interno della cellula verso l'esterno e, quindi, la disidratazione, ed evitare il congelamento intracellulare, che può verificarsi sia prima sia, in parte, dopo l'inizio dell'enucleazione del ghiaccio. Per un'appropriata disidratazione cellulare è molto importante una corretta velocità di raffreddamento che consenta alla cellula di stabilire un equilibrio con la soluzione esterna. In questo modo la soluzione esterna congela prima del medium intracellulare grazie all'effetto protettivo delle membrane; l'ambiente extracellulare diventa, così, ipertonico, e consente un flusso d'acqua dall'interno verso l'esterno della cellula, garantendo la disidratazione. Una bassa velocità di raffreddamento causerebbe una eccessiva disidratazione cellulare e una significativa concentrazione intracellulare dei soluti con conseguente disturbo dell'equilibrio. Qualora, invece, la velocità di congelamento fosse troppo alta non ci sarebbe tempo sufficiente ad ottenere una idonea disidratazione, e in questo caso sarebbe facilitata la formazione dei cristalli di ghiaccio con conseguenti esiti letali.

Quindi, a velocità di raffreddamento più basse di quella ottimale, la morte cellulare è causata da lunghi periodi di esposizione alle condizioni ipertoniche e dalla tossicità dei crioprotettori (CP); a velocità

di raffreddamento più alte di quella ottimale, la morte cellulare è imputabile, invece, alla formazione di ghiaccio intracellulare. Ne consegue che, 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 identificata per diversi tipi cellulari, ma questo parametro non è ancora stato individuato per le cellule riproduttive.

Durante lo scongelamento le cellule congelate passano attraverso le stesse fasi precedentemente descritte, ma ovviamente l'ordine di queste risulta invertito. Il campione congelato comincia a fondere, i CP e l'acqua sono trasportati attraverso le membrane cellulari verso l'esterno della cellula per le caratteristiche ipertoniche del mezzo in cui si trovano; proprio in questa fase, prima della completa fusione del campione, è possibile l'accrescimento dei cristalli di ghiaccio intracellulare. Per limitare i danni che si possono verificare nel passaggio dallo stato solido a quello liquido, è stato dimostrato, in numerosi esperimenti, che rapide velocità di scongelamento risultano generalmente migliori di quelle lente; a questo scopo le procedure di scongelamento convenzionali prevedono il mantenimento della paillette in aria per 40 secondi, in modo da far risalire la temperatura fino a -

50°C, e poi il trasferimento della stessa in un bagno caldo a 30°C per 1 minuto circa.

## ***Composizione dei Media di Congelamento***

Per ottimizzare la sopravvivenza cellulare, al medium di congelamento si aggiungono i crioprotettori, che possono essere definiti come sostanze in grado di proteggere le cellule e minimizzare i danni durante le fasi di congelamento e scongelamento.

I CP possono essere suddivisi in tre gruppi principali:

- 1) CP permeabili a basso peso molecolare (metanolo, glicole etilenico (EG), 1,2-propandiolo, dimetilsolfossido (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).

Ogni gruppo di CP ha una funzione diversa durante i processi di congelamento e scongelamento, anche se l'azione crioprotettiva specifica di questi differenti composti non è stata interamente chiarita. Quello che si sa a riguardo è che i CP permeabili a basso peso molecolare sono sempre necessari, in quanto prima del congelamento rimpiazzano, per osmolarità, l'acqua all'interno delle cellule, e

combinati con velocità di congelamento basse e controllate, riducono i cambiamenti del volume cellulare e minimizzano la formazione intracellulare di cristalli di ghiaccio. L'azione crioprotettiva dei CP non permeabili a basso peso molecolare è dovuta alla capacità di indurre una disidratazione delle cellule prima del congelamento, che comporta la riduzione della formazione dei cristalli di ghiaccio; questo secondo gruppo deve necessariamente essere combinato con i CP permeabili per essere efficace durante il congelamento. Per quanto riguarda, invece, i CP ad alto peso molecolare, questi hanno il compito di proteggere le cellule durante il congelamento/scongelo modificando la forma e la grandezza dei cristalli di ghiaccio in modo da renderli innocui. Oltre a queste caratteristiche, alcuni CP posseggono anche altre funzioni protettive nei confronti delle cellule durante il congelamento come, ad esempio, la capacità di stabilizzare le strutture intracellulari e le membrane.

Il glicerolo, il DMSO e il glicole propilenico sono stati, fino all'ultimo decennio del secolo scorso, i CP più comunemente usati. L'EG è stato usato per la prima volta da Miyamoto e Ishibashi nel 1977-1978; il peso molecolare di quest'ultimo è 62.07 rispetto a 92.10 del glicerolo, 76.10 del glicole propilenico e 78.13 Da del DMSO e ciò spiega la sua alta permeabilità e, conseguentemente, la sua maggiore versatilità di utilizzo (Bracke e Niemann, 1995). L'efficacia dell'EG come

CP per crioconservare embrioni bovini è stata dimostrata da Voelkel e Hu nel 1992, i quali lo utilizzarono ad una concentrazione di 1.5 M. È stato però nel 1999 che, grazie ad uno studio di Sommerfield e Niemann, è stata dimostrata la bassa tossicità dell'EG testandolo a partire da concentrazioni di 1.8 M fino a 8.9 M. Grazie a queste caratteristiche di alta permeabilità e bassa tossicità, e alle alte percentuali di gravidanza in seguito al suo utilizzo nelle soluzioni di crioconservazione, l'EG è diventato il CP più largamente usato.

Per la crioconservazione di oociti/embrioni con le tecniche di congelamento convenzionale si utilizza, di solito, un singolo CP, come il glicerolo, il glicole etilenico (EG) o il propandiolo (Schneider U. 1986); nel caso, invece, di congelamento rapido o di vitrificazione è preferibile l'impiego di una miscela di CP, come, ad esempio, glicerolo e EG, glicerolo e propandiolo, propandiolo ed EG, in combinazione con saccarosio, trealosio o galattosio (Leibo SP. e Oda K. 1993; Rayos AA. et al., 1992; Scheffen B. et al., 1986). Questo stratagemma viene impiegato in natura da una varietà di insetti tolleranti il freddo che utilizza sistemi complessi di CP (Baust JG. 1981; Salt RW. 1957), esemplificabili nella combinazione di due o più CP a basso peso molecolare (Somme L. 1982).

In generale si può affermare che gli alcoli sono in grado di regolare la disidratazione e proteggere le strutture proteiche, mentre alcuni disaccaridi stabilizzano la struttura delle membrane.

Diversi studi sono stati fatti per stabilire l'esatta funzione di ogni CP e come affrontare i problemi che derivano dal loro uso; è stato ad esempio osservato che il glicerolo è uno scarso stabilizzatore delle strutture di membrana, e che, ad alte concentrazioni e temperature, può indurre la fusione (Womersley C. et al.,1986); sembra però che questo problema possa essere evitato mediante una rapida rimozione del CP allo scongelamento.

Le differenti proprietà dei vari CP suggeriscono che ciascuno protegge le cellule contro i danni da congelamento in una maniera specifica e che la soluzione crioprotettiva più efficiente potrebbe essere data da una combinazione appropriata di CP, che però non è ancora stata individuata.

I media che di solito contengono i CP sono preparati ad un pH stabile compreso tra 7.2 e 7.4; quello più comunemente usato è il PBS (phosphate buffered saline), ma anche altri media come il TCM-199 o la semplice soluzione fisiologica sono frequentemente impiegati. Nei media sono, inoltre, presenti proteine di origine biologica come, ad esempio, il siero che ha proprietà surfattanti, stabilizza le membrane cellulari e previene l'indurimento della zona pellucida; la BSA e le AFP-

anti freezing proteins (proteine anticongelanti isolate da organismi tolleranti il freddo).

## ***Danni e punti critici nei processi di congelamento***

I danni si possono verificare in tutte le fasi della procedura di crioconservazione; capirne le cause e i meccanismi potrebbe aiutare lo sviluppo di nuovi metodi per evitare danni irreversibili o letali.

Gli oociti e gli embrioni subiscono danni morfologici e funzionali significativi nel processo di crioconservazione. L'estensione del danno dipende da diversi fattori quali la dimensione e la forma delle cellule, la permeabilità delle membrane e la qualità stessa delle cellule. Tutti questi fattori possono variare notevolmente a seconda della specie, dello stadio di sviluppo e, nel caso degli embrioni, dell'origine (in vivo o in vitro).

Durante il congelamento, possono essere distinti tre tipi di danno a seconda dell'intervallo di temperatura che le cellule stanno attraversando. A temperature relativamente alte, tra +15 e -5 °C, il danno maggiore si ha a carico di strutture quali le gocce lipidiche citoplasmatiche e i microtubuli (Aman RR e Parks JE.1994; Leibo SP. et al.,1996; Martino A, Pollard JA. et al., 1996a; Zenzes MT. et al., 2001); mentre quest'ultimo danno è reversibile, il primo è sempre di natura irreversibile e, per la crioconservazione di oociti ed embrioni ricchi di lipidi, risulta una delle maggiori cause di morte cellulare. Tra

-5 e -80 °C, la formazione dei cristalli di ghiaccio a livello extracellulare e ancor di più intracellulare è la principale fonte di danno, mentre tra -50 e -150 °C i danni che si verificano in maggior misura sono quelli meccanici da frattura della zona pellucida o del citoplasma, sebbene il meccanismo e le esatte temperature in cui ciò avviene non sono ancora stati ben definiti. Lo stoccaggio al di sotto dei -150 °C sembra essere la fase meno pericolosa dell'intera procedura di crioconservazione; in questo caso lo scongelamento accidentale rappresenta il danno che più di frequente tende a verificarsi, mentre l'effetto delle radiazioni sembra essere più innocuo di quanto si pensasse e inoltre non sembra essere una fonte significativa di danno per il DNA (Rall WF. 2001). Un altro inconveniente che può, però, verificarsi durante lo stoccaggio è la probabilità di trasmissione di malattie infettive, tra i campioni stoccati, che potrebbe verosimilmente essere mediata dall'azoto liquido.

Come già detto, tutti questi fenomeni e i danni che ne conseguono, che si osservano durante la fase di congelamento, sono gli stessi che possono verificarsi nella fase di scongelamento, ma ovviamente l'ordine risulta inverso. Gli oociti e gli embrioni subiscono danni considerevoli sia nel congelamento che durante lo scongelamento. Fortunatamente essi hanno anche una notevole, a volte addirittura sorprendente, capacità di riparare completamente o anche solo parzialmente i danni subiti e in molti casi di continuare un normale sviluppo.

Ciò che ci si propone quando si mette a punto una procedura di crioconservazione è prima di tutto minimizzare i danni a carico del campione e poi di agevolarne la rigenerazione. A questo scopo tutte le strategie di crioconservazione finora sviluppate differiscono per lo più per il tipo di CP e per le velocità di congelamento/scongelo impiegate.

Come già esposto precedentemente in maniera dettagliata, la caratteristica dei CP è quella di diminuire i danni da freddo proteggendo le cellule; sfortunatamente la maggior parte di questi ha anche degli effetti negativi come quello di essere tossici, e di creare scompensi osmotici.

Per quanto riguarda la velocità, quella di raffreddamento può variare, a seconda del metodo applicato, da graduale, quando si passa dalla temperatura fisiologica a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; altamente controllata, quando si va da  $-40$  a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguita dall'immersione in  $\text{LN}_2$ ; a velocità di congelamento rapide ( $200\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ ) o ultrarapide (da  $20000$  a  $100000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ ). Come il congelamento, anche lo scongelamento può essere fatto a differenti velocità, ma, nella maggior parte dei casi, si usano alte velocità.

La scelta dei CP, la loro concentrazione e successiva rimozione, così come le velocità di scongelamento sono di norma determinate dalle velocità di congelamento usate. Il meccanismo con cui i CP

causano i danni sopra descritti, o anche il meccanismo protettivo con cui essi agiscono non è ancora ben conosciuto, ma probabilmente ciò è imputabile ad una analisi dei danni non corretta. Questo perché le osservazioni morfologiche delle strutture intracellulari durante la fase di raffreddamento, soprattutto al di sotto di 0 °C, sono difficili da eseguire, così come risulta quasi impossibile l'analisi funzionale di specifici processi in un dato momento. Escludendo alcune attrezzature sofisticate e molto costose, l'unico modo per cercare di analizzare l'effetto dei CP è quello di usarli senza sottoporre i campioni a congelamento e scongelamento (test di tossicità), oppure basandosi sui danni che si possono osservare dopo lo scongelamento. Comunque, l'effetto di un dato crioprotettore può differire notevolmente a seconda della temperatura a cui questo viene utilizzato, per questo motivo analisi post-scongelamento potrebbero portare a delle conclusioni errate. Di conseguenza l'interpretazione dei danni da congelamento e anche degli effetti protettivi varia molto. Se si tiene conto di ciò, non dovrebbe stupire il fatto che la stragrande maggioranza delle tecniche di crioconservazione sono state stabilite empiricamente, basandosi sui cambiamenti morfologici osservati allo stereomicroscopio, e sono state giustificate dai risultati di sopravvivenza ottenuti in vivo e in vitro. In molti casi si è cercato, tramite la formulazione di ipotesi, di chiarire a posteriori questi complessi meccanismi, ma ciò non è bastato a trovare

delle spiegazioni logiche. Tant'è vero che esistono situazioni in cui gli oociti e gli embrioni non solo sopravvivono al congelamento, ma sono in grado di riprendere lo sviluppo, sebbene i danni indotti dalle tecniche applicate avrebbero dovuto causarne la morte, come, ad esempio, nel caso del congelamento ultrarapido.

## ***Principali tecniche di crioconservazione***

Fin dai primi successi nella crioconservazione di embrioni di mammifero negli anni '60, sono stati definiti due grandi gruppi di metodi: congelamento in presenza di equilibrio (lento) e congelamento in assenza di equilibrio (rapido e vitrificazione). Stoccaggio, scongelamento e reidratazione, ossia la rimozione dei CP, differiscono solo leggermente tra i due gruppi (tranne alcune eccezioni), mentre la principale differenza sta nel tipo di CP e nella fase di raffreddamento.

**Il congelamento lento** è stato introdotto per primo, ed è il metodo 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, raffreddamento lento controllato e velocità di riscaldamento relativamente alte.

Le procedure convenzionali di congelamento lento prevedono differenti passaggi:

1. esposizione degli embrioni a temperatura ambiente a concentrazioni molari di CP a basso peso molecolare, come EG, glicerolo, DMSO o glicole propilenico (PG), fino al raggiungimento dell'equilibrio;
2. abbassamento della temperatura fino a -5 / -7 °C;

3. induzione della cristallizzazione o seeding;
4. congelamento lento controllato con una velocità di  $0.3/1^{\circ}\text{C}$  al minuto;
5. immersione in azoto liquido a  $-30/-70^{\circ}\text{C}$  e conservazione a  $-196^{\circ}\text{C}$ ;
6. scongelamento controllato con una velocità intorno ai  $250^{\circ}\text{C}$  al minuto (ad es. in acqua a  $25^{\circ}\text{C}$ );
7. rimozione del CP a temperatura ambiente prima della messa in coltura o del trasferimento.

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. Grazie alla bassa velocità di raffreddamento e al seeding, la crescita del ghiaccio nella soluzione extracellulare risulta controllata, di conseguenza si ha un considerevole aumento della concentrazione di ioni, macromolecole e altri componenti, inclusi i crioprotettori, nel rimanente fluido. 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-scongelo, fondamentale risulta la corretta esecuzione di ogni passaggio che mira a ridurre al minimo i danni e a preservare le funzioni cellulari durante la procedura.

Le procedure di congelamento lento per embrioni di mammifero sono eccezionalmente simili al meccanismo di protezione sviluppato da differenti animali tolleranti il freddo (Storey KB. e Storey JM. 1990). Il fattore chiave, che consente a questi animali di sopravvivere alle basse temperature, è la produzione di una grande quantità di CP a basso peso molecolare, come il glucosio e il glicerolo, e una varietà di altri alcoli e zuccheri (Baust JG 1981; Salt RW. 1957; Somme L 1982; Zachariassen KE. 1980). Questi composti sembrano avere la funzione di proteggere la struttura cellulare, prevenendo la formazione dei cristalli di ghiaccio durante il congelamento e lo scongelamento. In questi animali, quando i fluidi intracellulari iniziano ad equilibrarsi con l'alta concentrazione di CP permeabili e la temperatura scende sotto lo zero, esistono specifiche proteine enucleanti il ghiaccio che inducono la formazione dei cristalli di ghiaccio (Zachariassen KE. 1980). Inoltre, questi animali tolleranti il freddo si servono di composti ad alto peso molecolare chiamati "isteresi termiche" o "antifreeze proteins" (Knight CA. e Duman JG. 1986), che riescono ad abbassare il

punto di congelamento consentendo la disidratazione cellulare (Duman JG.1982).

Negli ultimi 25 anni le ricerche sulla crioconservazione di embrioni di mammifero sono state finalizzate alla semplificazione delle procedure di congelamento/scongelo, all'incremento della sopravvivenza degli embrioni dopo lo scongelamento e allo sviluppo di soluzioni di CP, che non richiedono l'uso di sostanze di origine biologica.

Come risultato di queste ricerche, è stata ideata la tecnica one step straw allo scopo di trasferire direttamente l'embrione congelato/scongelo nell'animale ricevente in maniera da rendere i trasferimenti stessi più pratici. In questo modo, infatti, si velocizza la procedura bypassando la fase di scongelamento e non è più necessaria la valutazione microscopica dell'embrione dopo lo scongelamento; ciò elimina la necessità di disporre di personale specializzato diminuendo così i costi. La tecnica consiste nel caricamento, all'interno della paillette, sia del terreno di congelamento (costituito da un CP a basso peso molecolare, come il glicerolo) contenente l'embrione, sia di quello di scongelamento (costituito da un CP non permeabile, come il saccarosio), separati da bolle d'aria per evitare che questi possano venire accidentalmente a contatto durante i vari steps. Al momento del trasferimento, che corrisponde a quello dello scongelamento, la

paillette, prelevata dal bidone di stoccaggio, viene agitata per consentire la miscelazione delle due soluzioni e ciò comporta la rimozione del glicerolo dall'embrione, grazie al gradiente di concentrazione creato dalla soluzione di saccarosio, evitando così lo shock osmotico. Il glicerolo viene rilasciato insieme all'acqua grazie alla contrazione che l'embrione subisce per effetto del gradiente creato dal saccarosio. L'embrione poi si reidrata quando viene a contatto con i fluidi uterini della ricevente dopo il trasferimento e, quindi, riprende il suo volume isotonic. Le percentuali di gravidanza con il metodo one step straw si avvicinano a quelle che si ottengono con le procedure convenzionali, ma i risultati sono abbastanza variabili (Leibo SP.1984). I risultati non costanti potrebbero essere dovuti alla difficoltà di miscelare le soluzioni di CP all'interno della paillette e alla perdita occasionale dell'embrione che, talvolta, può rimanere imbrigliato nello stantuffo di cotone della paillette stessa. Inoltre, è stato dimostrato che le alte concentrazioni di saccarosio, ad elevate temperature possono causare danni all'embrione (Palasz AT. et al.,1992).

Recentemente sono state apportate alcune modifiche al metodo one step straw impiegando CP altamente permeabili, come l'EG o l' 1,2-PG (Herman HA. et al., 1994; Voelkel SA. e Hu YX. 1992). A differenza del glicerolo, che ha un peso molecolare più alto e penetra nella membrana cellulare più lentamente causando uno shock osmotico,

questi CP penetrano nelle membrane cellulari molto rapidamente per cui gli embrioni congelati/scongelati subiscono uno shock osmotico limitato quando sono trasferiti direttamente in ambiente isotonico.

Da quanto detto fino ad ora, si può facilmente dedurre che 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.

**Il congelamento in assenza di equilibrio o congelamento rapido** si riferisce alle procedure di crioconservazione in cui le cellule e i tessuti non sono in equilibrio con le alte concentrazioni di CP permeabili e non permeabili, e le velocità di congelamento applicate sono molto alte; in questo caso le alte concentrazioni di CP impiegate causano una rapida disidratazione cellulare e il congelamento avviene prima che si raggiunga l'equilibrio. Con questa tecnica, le cellule parzialmente disidratate sono congelate utilizzando alte velocità di congelamento di circa 1250 °C/min.

La caratteristica principale che si evidenzia nella crioconservazione embrionale 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 AA. et al., 1992; Takashi Y. et al., 1992; Shaw JM. et al., 1991). Questa procedura risulta naturalmente molto più rapida di quella precedentemente descritta; infatti, gli embrioni vengono esposti 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 congelati in LN<sub>2</sub> dopo essere stati esposti a temperature intermedie sui vapori di azoto liquido (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 embrionali. In queste condizioni, però, è possibile la formazione di ghiaccio intracellulare con conseguenti danni all'embrione qualora le velocità di riscaldamento durante lo scongelamento non siano adatte.

Nel tentativo di rendere più economico e semplificare la procedura di crioconservazione negli ultimi anni si è dato spazio alla tecnica della vitrificazione. I risultati promettenti, le grandi potenzialità e i numerosi ed indiscutibili vantaggi che sono risultati dall'impiego di questa tecnica fino ad ora ne hanno consentito un'ampia diffusione, ed è per questo che, al fine di comprenderne meglio le caratteristiche, risulta essenziale dedicare una sezione dettagliata alla vitrificazione.

## ***Vitrificazione***

Con questo termine si intende un processo fisico grazie al quale una soluzione passa dallo stato liquido a quello vetroso, mediante congelamento rapido, bypassando la formazione di cristalli di ghiaccio e mantenendo le proprietà di un liquido in forma solidificata. Il fenomeno può essere considerato come conseguenza di un aumento estremo della viscosità e richiede velocità di raffreddamento alte o l'uso di soluzioni di CP che deprimono la formazione di ghiaccio e incrementano la viscosità a basse temperature.

Per ottenere la vitrificazione di una soluzione a velocità di congelamento praticabili (con l'immersione diretta in azoto liquido si ha una discesa della temperatura di circa 2500 °C/min) sono necessarie concentrazioni molto alte (da 5 a 7 M) dei CP comunemente usati che, però, in queste quantità, risulterebbero molto tossici per le cellule. Ipoteticamente, la vitrificazione potrebbe essere realizzata con una concentrazione 1.5 M di qualsiasi CP, ma sarebbe necessaria una velocità di congelamento di circa 15000 °C/min, cosa che potrebbe essere attuata solo con l'utilizzo di attrezzature sofisticate e costose; in teoria l'estremo aumento della velocità di raffreddamento fino a circa  $10^7$  °C/sec consentirebbe di ottenere la vitrificazione anche in acqua pura, ma i limiti dell'embriologia sono ben lontani dal raggiungere

queste velocità (Rall WF 1987). Quindi, una condizione essenziale al fine di ottenere una corretta vitrificazione è il raggiungimento di un'alta velocità di raffreddamento e di riscaldamento; maggiore è la velocità di raffreddamento e più semplice risulta il raggiungimento dello stato vetroso.

L'utilizzo di elevate concentrazioni di crioprotettori in ambiente extracellulare, determina un aumento della viscosità della soluzione ed una disidratazione dell'embrione con parziale diffusione di crioprotettori a livello intracellulare. Questi fenomeni, associati ad un rapido abbassamento della temperatura, evitano la formazione di cristalli di ghiaccio.

Tuttavia la formazione di cristalli di ghiaccio è solo uno dei problemi che si possono verificare quando gli embrioni vengono sottoposti a procedure di crioconservazione. In realtà, vari sono i fattori che possono danneggiare l'embrione come, ad esempio, l'effetto tossico apportato dai CP, l'elevata concentrazione di elettroliti in ambiente intracellulare, le lesioni osmotiche, i danni da freddo quali le rotture della zona pellucida e/o dell'embrione stesso (Kasai M. et al., 1996; Martino A. et al., 1996) e inoltre, lesioni degli organelli intracellulari, del citoscheletro e delle comunicazioni intercellulari (Dobrinsky JR. 1996; Massip A. et al., 1995; Saha S. et al., 1996).

Con la vitrificazione uno di questi problemi viene evitato: la formazione di cristalli di ghiaccio. Ciò avviene grazie al passaggio rapido attraverso la zona definita di temperatura critica tra +15 e -5 °C (Vajta G. 2000); ne consegue una protezione nei confronti dei danni da freddo, ma non di quelli osmotici e tossici, dovuti all'uso delle elevate concentrazioni di CP, che risultano, invece, incrementati rispetto al congelamento lento. 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); di conseguenza per poterlo utilizzare è necessario associarlo ad altri CP (Ali J. e Shelton JN. 1993). In questo modo, si è sperimentato l'uso combinato di due o più CP, per cercare di diminuire la tossicità specifica di ognuno di essi; è stato così dimostrato che nelle soluzioni di vitrificazione ci deve essere almeno un CP permeabile, (e in questo caso la scelta più ovvia è stata quella dell'EG), e uno o due sono. Componenti addizionali permeabili come glicole propilenico, acetamide, glicerolo, raffinosa e dimetilsolfossido (DMSO) sono stati testati in

varie combinazioni (de la Pena EC. et al., 2001; Kasai M. et al., 2004), e quella glicole etilenico- DMSO è sembrata quella migliore (Ishimori H. et al., 1992a; 1992b; 1993), mostrando una permeabilità maggiore rispetto a quella riscontrata per i singoli componenti (Vincente JS. e Garcia-Ximenez F. 1994). Per quanto riguarda i crioprotettori non permeabili, come i mono e i disaccaridi, il saccarosio, il trealosio, il glucosio e il galattosio sono quelli più utilizzati (Ali J. e Shelton JN1993; Kasai M. 1997; Wright DL. et al., ). Recentemente, così come il glicole etilenico, 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 WF. 1987); infatti, il saccarosio non sembra avere effetto tossico a basse temperature, e influisce positivamente sulla sopravvivenza embrionale quando applicato per bilanciare il rigonfiamento dopo riscaldamento (Kasai M. 1986; Kasai M. et al., 1992; Vajta G. et al., 1997a). Sebbene differenti polimeri siano stati sperimentati, inclusi poliviilpirrolidone, glicole polietilenico, Ficoll, destrano e polivinilalcol (Leibo e Oda, 1992; Ohboshi et al., 1997; Shaw et al., 1997; Naitana et al., 1997; Kuleshova et al., 2001; Asada et al., 2002), l'unico ad essere largamente utilizzato è il Ficoll, risultato il meno tossico (Kasai, 1994) da solo o in combinazione con glicole etilenico e saccarosio (Kasai M. et al., 1990). Sfortunatamente la teoria

di rimpiazzare la maggior parte dei crioprotettori permeabili con i polimeri (Kuleshova et al., 2001) è risultata solo in un parziale successo in quanto i CP non permeabili sia usati da soli che in combinazione, consentirebbero solo una leggera diminuzione di quelli permeabili.

Generalmente per quanto riguarda le modalità di esposizione alle soluzioni con i CP, diversi autori suggeriscono l'uso di un protocollo con due passaggi, nel primo dei quali la soluzione contiene una concentrazione di CP pari al 20-50 % di quella contenuta nella soluzione finale usata nel secondo passaggio. Negli ultimi anni, si è diffusa una nuova tendenza per quel che concerne i tempi di esposizione alle soluzioni di vitrificazione; mentre prima i metodi prevedevano un'esposizione più breve possibile, che per la prima soluzione era compresa tra 1 e 3 minuti, e per quella finale era solo di pochi secondi, recentemente molti autori utilizzano un passaggio nella prima soluzione che va dai 5 ai 15 minuti, seguita da un'esposizione di circa 1 minuto alla soluzione finale (Papis K. et al., 1999, 2000; Kuwayama et al., 2005a; b). Questo approccio potrebbe aumentare l'effetto tossico, ma risulterebbe in una protezione migliore per l'intera cellula, specialmente nel caso in cui il rapporto superficie/volume è basso come negli oociti e negli stadi embrionali precoci. Comunque anche nel caso delle blastocisti, non sempre l'esposizione più breve è

quella migliore; infatti un'esposizione di 25 sec nella soluzione finale, con la concentrazione più alta di CP, ha dato un eccellente percentuale di sopravvivenza dopo vitrificazione di blastocisti di maiale con il metodo delle Open Pulled Straw (OPS) (Vajta G. et al., 1997b; Holm P. et al., 1999), ma le gravidanze sono state ottenute solo da un altro gruppo in cui, per difficoltà tecniche, il tempo di incubazione era stato esteso a 1 minuto (Berthelot F. et al., 2000).

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. È importante precisare, a questo punto, che con il termine "riscaldamento" si intende quella fase che per gli altri sistemi di crioconservazione viene definita scongelamento; questa differente terminologia è dovuta al fatto che con la vitrificazione il cambiamento di stato della soluzione si ha senza passare per la fase solida, ma direttamente da quella vetrosa a quella liquida e viceversa.

Il protocollo standard di vitrificazione prevede una prima fase in cui gli embrioni sono esposti a soluzioni contenenti basse concentrazioni di CP per un breve periodo (al massimo 3 minuti), la qual cosa consente di ridurre il tempo di esposizione alla soluzione vitrificante vera e propria, che risulta tossica per l'elevata

concentrazione dei CP. Il rispetto dei tempi nelle procedure di vitrificazione è determinante ai fini dei risultati, ed anche trenta secondi in più o in meno possono avere un grande effetto sulle percentuali di sopravvivenza.

Un punto critico della vitrificazione è rappresentato sicuramente, nella fase di raffreddamento, dalla modalità di immersione della paillette in azoto liquido; in questo passaggio si assiste a cambiamenti estremi di pressione che possono provocare l'esplosione della paillette, con la conseguente perdita del campione. Anche nel caso in cui ciò non accada, c'è comunque un'alta probabilità che si abbiano altri tipi di danno come la rottura della zona pellucida e/o dell'embrione che sono una diretta conseguenza del cosiddetto effetto "scissor-like", fenomeno per cui una soluzione parzialmente solidificata si rompe e si sposta, all'interno della paillette, a causa degli estremi cambiamenti di pressione. La frequenza con cui questo fenomeno si verifica è il motivo per cui, nella maggior parte dei protocolli di vitrificazione, esiste, nel congelamento, una fase di pre-raffreddamento con una graduale immersione della paillette in azoto liquido o con un'esposizione di questa su vapori di azoto, e nel riscaldamento, una fase in cui la paillette viene tenuta per diversi secondi (circa 15) in aria prima dell'immersione in acqua a 37-39 °C. In questo modo si cerca di ridurre la velocità del cambiamento di temperatura e limitare i danni

che ne conseguono, ma tenendo conto del fatto che, sia la temperatura dei vapori d'azoto che quella ambiente, sono molto variabili, risulta comunque difficile eseguire gli esperimenti sempre nelle stesse condizioni pure effettuando le prove nello stesso laboratorio.

Così come nel raffreddamento, anche nella fase di reidratazione post-riscaldamento, è fondamentale il rispetto dei tempi, visto che gli embrioni sono a contatto con elevate concentrazioni di CP. A questo scopo, per limitare l'effetto tossico dell'alta concentrazione di CP, la soluzione di riscaldamento, generalmente con un CP non permeabile, viene caricata all'estremità della paillette stessa (Saha S. et al., 1996). Nel caso delle OPS, o di altri metodi in cui non si ricorre all'uso di paillette tradizionali, questa fase avviene immergendo direttamente la parte contenente l'embrione nell'apposita soluzione di riscaldamento.

In generale, la fase di riscaldamento dopo la vitrificazione, viene eseguita allo stesso modo che nelle altre procedure, comprese quelle di congelamento lento. Come precedentemente accennato, la paillette viene immersa direttamente nella soluzione di riscaldamento dopo una breve esposizione (da 1 a 3 secondi) all'aria per evitare fratture dovute all'immersione troppo rapida del campione in una soluzione a temperatura più alta. Di solito, nei protocolli di riscaldamento, la diluizione della soluzione di vitrificazione contenente il campione viene eseguita mediante passaggi seriali in soluzioni, a concentrazioni

decrementi di saccarosio, in modo da bilanciare il rigonfiamento causato dalla lenta fuoriuscita dei crioprotettori permeabili dalle cellule. Nel caso del trasferimento diretto, la diluizione avviene in un unico step, trasferendo immediatamente l'embrione nella ricevente. Sebbene in questo modo l'inappropriata diluizione dei CP tossici e lo shock osmotico dovrebbero danneggiare il campione, è stato dimostrato che questa diluizione in un unico passaggio (one-step dilution) non ha abbassato la sopravvivenza in vitro nel bovino (Kuwayama, 1994; Vajta et al., 1997a, 1999), e che, il trasferimento di embrioni con l'utilizzo di questa metodica, o altre analoghe ad essa, dopo vitrificazione ultrarapida, ha portato alla nascita di prole sia nel bovino (Tecirlioglu et al., 2004) che nella pecora (Isachenko et al., 2003c).

Per cercare di incrementare la sopravvivenza post-riscaldamento di oociti ed embrioni crioconservati con la tecnica della vitrificazione, molti autori hanno concentrato i propri sforzi sui differenti media, CP e sui processi di equilibrio e diluizione. Molti nuovi metodi cercano di incrementare la velocità di raffreddamento, visto che questo consentirebbe di usare una minore concentrazione di CP e, quindi, di ridurre i danni da freddo. La maggior parte dei metodi di vitrificazione, inizialmente, utilizzava le tradizionali paillette da inseminazione per caricare gli embrioni o oociti. Queste ultime, 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'LN<sub>2</sub>. I primi tentativi, in questo senso, sono stati fatti usando l'approccio più semplice: il gocciolamento del campione direttamente sull'LN<sub>2</sub> senza l'utilizzo di un contenitore; infatti Riha et al. nel 1991 (Riha J. et al., 1991), hanno riportato, il 58 % di gravidanze dal trasferimento di embrioni bovini prodotti in vitro e vitrificati con questa tecnica. Ben presto, però, sono emersi i limiti di questa tecnica, uno dei quali è sicuramente dovuto al fatto che per formare una goccia è necessaria una quantità relativamente grande di soluzione (circa 5 µl); inoltre, quando la goccia viene depositata sulla superficie a contatto con l'LN<sub>2</sub> comincia a fluttuare e a percorrere traiettorie che non sono prevedibili creando, così, una situazione difficile da controllare. Questo fenomeno può essere spiegato dal fatto che l'LN<sub>2</sub> viene impiegato, di solito, alla sua temperatura di ebollizione e di conseguenza tutto ciò che è più caldo e viene a contatto con esso induce un'ebollizione continua e una forte evaporazione sulla superficie. In questo caso il vapore funziona da

strato isolante diminuendo la velocità di raffreddamento del campione. Quindi, per aumentare la velocità di raffreddamento, è preferibile trasferire il calore attraverso il liquido piuttosto che attraverso il vapore, in quanto la conducibilità termica del primo è maggiore.

Il primo metodo che ha cercato di rendere concreto e di sfruttare i vantaggi dell'approccio con volume minimo di soluzione e diretto contatto del campione con LN<sub>2</sub> è stato quello che utilizzava la griglia del microscopio elettronico come carrier (Steponkus et al., 1990; Martino et al., 1996b; Choi et al., 2000; Cho et al., 2002). In questo ingegnoso metodo, la dimensione della goccia è molto piccola e, dopo il caricamento, la maggior parte di questa viene rimossa mettendo la griglia su una membrana filtrante; inoltre, grazie alle sue caratteristiche di termoconduttività, la griglia metallica è in grado di aumentare sia la velocità di raffreddamento che quella di riscaldamento; in più, la soluzione di vitrificazione riesce a fissare bene il campione alla griglia durante tutta la metodica, impedendo che questo vada perso e facilitandone il rilascio al riscaldamento. Lo stoccaggio viene di solito fatto in cryovials previamente riempite con LN<sub>2</sub> (Son et al., 2005). Nonostante i vantaggi menzionati, gli elevati costi e le difficoltà di esecuzione, hanno impedito la diffusione di questi metodi.

Nell'ambito delle metodiche che sfruttano i volumi minimi di soluzione di vitrificazione e il diretto contatto con l'LN<sub>2</sub>, si è invece imposta la metodica delle OPS grazie alla sua facilità di esecuzione e ai costi contenuti. Questo nuovo strumento è stato ideato da Vajta G. et al. nel 1998 (Vajta G. et al., 1998) basandosi su un'idea semplice e facile da realizzare: riducendo il diametro di una normale paillette da inseminazione si può diminuire il volume di soluzione contenente il campione da vitrificare. Così come per la produzione dei capillari di vetro, le tradizionali paillette da inseminazione sono riscaldate (sulla fiamma o su una piastra calda) e tirate a mano e l'estremità più sottile viene tagliata con una lama ben affilata. Come si può osservare dalla

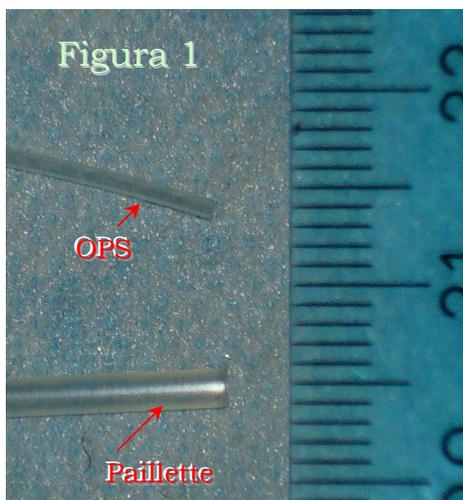


figura 1, il diametro interno e lo spessore della parete diminuiranno di circa la metà rispetto all'originale, passando dalle dimensioni di 1.7 mm a 0.8 mm e da 0.15 mm a 0.07 mm, rispettivamente; in questo modo il volume della soluzione contenente gli

embrioni da caricare risulta minore (circa 1  $\mu$ l vs 5  $\mu$ l), e la velocità di raffreddamento ottenibile aumenta di almeno dieci volte (20000°C/min), riducendo circa del 30 % la concentrazione e il tempo di esposizione ai CP. Un altro vantaggio è legato al fatto che, in questo

caso, si lavora con un sistema aperto, e cioè non si ha l'esplosione della paillette e il danno da fratture può essere, grazie ad alcune precauzioni, completamente eliminato. Il caricamento dell'embrione nella OPS è molto semplice da eseguire grazie allo sfruttamento del principio della capillarità per cui, toccando semplicemente con l'estremità più sottile della paillette una goccia di circa 1  $\mu$ l di soluzione di vitrificazione contenente gli embrioni, la goccia penetra nella OPS che viene poi immediatamente immersa in LN<sub>2</sub>. Grazie alle pareti trasparenti delle paillette è molto semplice accertarsi del caricamento del campione, nella fase di raffreddamento, e della sua espulsione, in quella di riscaldamento. Con questo tipo di paillette la soluzione con l'embrione si trova a diretto contatto con l'azoto liquido e lo stoccaggio avviene nello stesso modo delle paillette tradizionali con un unico inconveniente, peraltro facilmente risolvibile, dovuto al galleggiamento delle OPS in azoto liquido. Con la stessa facilità, nel riscaldamento, l'estremità dell'OPS è immersa direttamente nella soluzione di riscaldamento e, grazie alla dilatazione del gas caldo nella parte vuota della paillette, che si genera per effetto del cambiamento di temperatura tra l'LN<sub>2</sub> e la temperatura ambiente, la soluzione di vitrificazione contenente il campione viene facilmente espulsa dalla OPS permettendone una diluizione immediata. Un ulteriore punto a favore di questa metodica è dovuto alla possibilità di operare,

adottando alcuni accorgimenti, un trasferimento semi-diretto dell'embrione, il che naturalmente apporterebbe un considerevole vantaggio nella diffusione della crioconservazione e dell' ET in campo.

I principi delle OPS sono stati sfruttati per creare numerosi nuovi strumenti, come le micropipette di vetro (Kong et al., 2000), le OPS super-sottili (Isachenko et al., 2000), le paillette tirate e chiuse (Chen et al., 2001), le OPS sigillate (Lopez-Bejar and Lopez-Gatius, 2002), il sistema Cryotip (Kuwayama et al., 2005), ecc. Tutte queste versioni, che sfruttano il principio dei volumi minimi di soluzione di vitrificazione, hanno sensibilmente migliorato l'efficienza della crioconservazione rispetto ai metodi tradizionali, anche se nessuna di queste sembra aver dato risultati nettamente superiori rispetto alle altre tanto da poter essere considerata la metodica più competitiva.

Per cercare di migliorare i risultati ottenuti, sono state, quindi, sperimentate ancora nuove metodiche che sfruttano lo stesso principio. Lane et al. (Lane M. Et al., 1999) hanno riportato risultati soddisfacenti utilizzando il metodo "cryoloop vitrification" (CLV) per la vitrificazione di blastocisti umane e di topo. Il cryoloop è uno strumento caratterizzato da un cappio di nylon fissato ad un manico di acciaio inossidabile, inserito nel tappo di una cryovial. Immergendo questo cappio nella soluzione di vitrificazione, si crea un film sul quale viene posto l'embrione, che per il ridottissimo volume, quando immerso

in LN<sub>2</sub>, consente di raggiungere velocità di raffreddamento estremamente alte, fino a circa 700.000°C/min, così come descritto da Isachenko et al. nel 2003 (a). Oltre a questa, anche altre tecniche per la vitrificazione di oociti ed embrioni sono state applicate con successo, come ad esempio quella che utilizza una rete di nylon (Matsumoto et al. 2001), la tecnica “Minimum Drop Size” (Arav A. 1992), “Minimum Volume Cooling” (Hamawaki et al., 1999), il sistema di semi-paillette (Vanderzwalmen et al., 2000) ecc. L’ultima versione di queste procedure con volume minimo di soluzione di vitrificazione è il Cryotop, dove lo strumento su cui vengono messi gli oociti o gli embrioni è rappresentato da una sottile linguetta di polipropilene legata ad un manico di plastica, fornito di un cappuccio protettivo per la conservazione del campione vitrificato in azoto liquido (Kuwayama and Kato, 2000; Kuwayama et al., 2005a; b). Con questo metodo, gli oociti e gli embrioni sono posti sulla linguetta, dopodiché la soluzione viene quasi interamente rimossa mediante aspirazione e il campione direttamente immerso in LN<sub>2</sub>. Il metodo è semplice da eseguire e le velocità di raffreddamento e riscaldamento sono molto più alte di quelle raggiungibili con le OPS.

Stranamente, tutte queste tecniche con le quali si è riusciti ad incrementare la velocità di raffreddamento/riscaldamento non hanno causato rotture della zona o dell’embrione. Si è ipotizzato, come

precedentemente accennato, che con l'uso delle normali paillette da inseminazione le rotture, osservate in seguito alla rapida immersione in azoto, fossero dovute alla presenza delle bolle d'aria, necessarie per separare le soluzioni all'interno della paillette; probabilmente, la rapida contrazione ed espansione delle bolle d'aria, causate dai cambiamenti di temperatura, determinano il movimento delle soluzioni parzialmente solidificate, che risulta più dannoso dell'effetto diretto del cambiamento di temperatura stessa sull'embrione.

Dal confronto tra la crioconservazione mediante il congelamento lento convenzionale e la tecnica di vitrificazione, emergono dei vantaggi a favore di quest'ultima: il basso costo dell'attrezzatura, la semplicità delle procedure ed il breve tempo richiesto. L'attrezzatura necessaria consiste, infatti, in uno stereo microscopio ed un semplice contenitore per l'azoto, a fronte di una macchina costosa necessaria per il congelamento lento. Rispetto ai tempi di crioconservazione, la vitrificazione rappresenta sicuramente un sistema più veloce, sebbene le differenze si annullino quando è necessario crioconservare un numero consistente di embrioni. Infatti, per vitrificare una singola paillette sono necessari pochi minuti ma, considerando che ogni paillette, contenente un embrione, deve essere raffreddata singolarmente, su elevate quantità, i tempi si equivalgono, poiché le

macchine utilizzate per il congelamento lento consentono di congelare contemporaneamente 15-20 paillette.

Nonostante tutti i vantaggi ampiamente dimostrati quando si impiegano le tecniche OPS, CLV, del gocciolamento diretto in azoto liquido e Cryotop, che sono oggi quelle più promettenti, è importante accennare anche agli inconvenienti che si incontrano. Un comune denominatore per tutte queste procedure è il contatto diretto tra la soluzione di vitrificazione contenente l'embrione e l'azoto liquido. In tutti questi casi esiste, quindi, la possibilità che si verifichino contaminazioni virali; è stato, infatti, dimostrato che molti agenti patogeni possono sopravvivere anche in azoto liquido (Bielanski A. et al., 2000; Fountain D. et al., 1997). In uno studio effettuato da Bielanski et al. (2000), infatti, il 21.3 % dei campioni di embrioni vitrificati a diretto contatto con azoto liquido, previamente contaminato dal virus della diarrea bovina (BVDV), dall'herpesvirus-1 bovino (BHV-1) e dal virus dell'immunodeficienza bovina (BIV), è risultato positivo al BVDV ed al BHV-1. Al contrario tutti gli embrioni vitrificati in paillette sigillate erano negativi ai test per i tre virus. Questo potenziale rischio è il maggiore problema che limita la diffusione della tecnica della vitrificazione nell'embriologia umana e degli animali domestici, rappresentando per questi ultimi un serio impedimento all'importazione-esportazione di embrioni tra Paesi diversi. In realtà,

l'azoto liquido non rappresenta la fonte del pericolo, ma solo il mezzo attraverso il quale questa potenzialità potrebbe realizzarsi. Se infatti si analizzano tutti i passaggi che intervengono nell' IVEP e nella crioconservazione, ci si rende conto che in ognuno di essi è presente questo rischio. Infatti, la raccolta di embrioni, o quella di seme, le fasi a cui vengono sottoposti e i protocolli di crioconservazione non sono sterili; di conseguenza, in teoria, il contenuto di tutte le paillette, di tutte le cryovials e di tutti gli altri strumenti usati per crioconservare embrioni e oociti, potrebbero essere una fonte di infezione. In embriologia, l' $\text{LN}_2$  può essere contaminato dalla superficie di tutti gli strumenti usati, in quanto questi non sono maneggiati in condizioni completamente asettiche e, quindi, la presenza di agenti infettivi non è strettamente collegata alla rottura di un contenitore o all'uso di sistemi aperti, come nel caso delle OPS. Gli strumenti apparentemente sterili, come ad esempio le paillette sigillate nel congelamento lento, possono comunque essere infette, oppure la causa di infezione può essere dovuta ad una inappropriata decontaminazione delle pareti della paillette prima del caricamento o dell'espulsione del campione. In conclusione, si può dire che il pericolo di trasmissione di malattie mediate dall'azoto liquido è reale, ma non è esclusivo delle nuove metodiche di crioconservazione. D'altra parte c'è da precisare che fino ad ora non è stato riportato nessun caso documentato di trasmissione

di malattie mediate da l'LN<sub>2</sub> in seguito al trasferimento di embrioni congelati. Ciò, però, potrebbe anche essere dovuto al fatto che l'ovidutto e l'utero hanno un appropriato sistema di difesa in grado di eliminare gli agenti infettivi nelle quantità i cui essi possono essere presenti e, quindi, trasferiti durante una comune procedura di ET. È indubbio naturalmente che, nonostante finora non siano stati riportati casi di questo tipo, è doveroso tenere conto del rischio potenziale. A favore però delle più recenti procedure di vitrificazione vi è l'alto livello di sterilità che si riscontra nella manipolazione dei campioni, che risulta a volte addirittura maggiore paragonato a quello del comune congelamento lento. Gli approcci che consentono di minimizzare questi rischi finora descritti sono diversi, uno dei quali è sicuramente rappresentato dalla possibilità di separare la fase di raffreddamento da quella di stoccaggio, utilizzando LN<sub>2</sub> filtrato e, quindi, sterile, paillette sterili e, nel caso di sistemi aperti come le OPS, usare contenitori asettici. A tale scopo, recentemente, le OPS sono state inserite in un'altra paillette da 0.5ml prima dell'immersione in azoto liquido, procedura che ha sicuramente garantito una maggiore sterilità, a scapito però della velocità di raffreddamento che, in questo modo, risulta di almeno 100 volte più bassa rispetto all'originale metodo delle OPS e 10 volte più bassa rispetto alle normali paillette da inseminazione da 0.25 ml (Kuleshova and Shaw, 2000; Isachenko et

al., 2005a; b). In alternativa si potrebbe inserire la OPS, dopo l'avvenuta vitrificazione e operando in LN<sub>2</sub> sterile, in una normale paillette che viene poi sigillata prima dello stoccaggio.

## ***Fattori che influenzano la sopravvivenza al congelamento***

Esistono molteplici fattori che influenzano la sopravvivenza al congelamento; oltre a quelli di cui si è già ampiamente parlato, ossia la velocità di congelamento/scongelo, la tossicità dei crioprotettori e i tempi di esposizione ai CP, vanno ricordati anche la specie, lo stadio di sviluppo embrionale, il contenuto lipidico intracellulare, l'origine degli embrioni (prodotti in vivo o in vitro).

Nelle diverse specie di mammiferi, ci sono molte differenze nella sensibilità ai danni da congelamento, la maggior parte delle quali non sono ancora oggi del tutto comprese. Una prima valutazione, ovviamente approssimativa, sulla congelabilità di oociti ed embrioni, può essere fatta osservando le cellule al microscopio: un aspetto chiaro sembra essere indice di maggiore resistenza, mentre oociti ed embrioni più scuri, aspetto dovuto al maggiore contenuto lipidico, sembrano essere più fragili. Numerosi studi indicano che gli embrioni di bovino prodotti in vitro sono più sensibili alla crioconservazione di quelli prodotti in vivo; ciò sembrerebbe causato dal diverso rapporto tra lipidi e proteine (Leibo and Loskutoff, 1993; Pollard and Leibo, 1993); inoltre embrioni prodotti in vitro in presenza di siero di sangue sembrano essere meno criotolleranti di quelli prodotti in assenza di siero. La maggior parte di queste osservazioni, se non tutte, sembrano

strettamente connesse al contenuto lipidico citoplasmatico che si riscontra negli embrioni; infatti è noto che un maggior numero o anche una maggiore dimensione delle gocce lipidiche sono indice di una ridotta criotolleranza. Queste differenze, però, sembrano influenzate anche dalla specie e dal tipo di cellula (oocita o diversi stadi embrionali); infatti gli stress fisici che queste cellule subiscono durante le procedure di crioconservazione sono tollerati in maniera diversa (Leibo, 1981) e uno dei fattori che influenza tale comportamento sembra rappresentato dalla flessibilità delle membrane cellulari durante il congelamento. In questo caso lo stress osmotico è quello più dannoso, dati gli enormi cambiamenti di volume che le cellule subiscono a causa del movimento dell'acqua e dei CP. Le cellule con maggiore flessibilità di membrana subiscono di solito meno danni rispetto a quelle che posseggono membrane più rigide, e lo stress osmotico viene limitato se la permeabilità all'acqua e ai CP è più alta; quindi, le caratteristiche di membrana influenzano direttamente la congelabilità delle cellule. I maggiori componenti delle membrane cellulari sono fosfolipidi, colesterolo, altri lipidi e proteine. Eccetto le proteine, questi componenti possono essere manipolati con relativa facilità in molti modi intervenendo ad esempio sulla dieta degli animali donatori o anche modificando la composizione dei media di coltura.

Una fondamentale caratteristica delle membrane cellulari è che,

per la loro normale funzione, è necessario che queste si trovino in uno stato fluido piuttosto che in uno gelatinoso; certe regioni di alcune membrane cellulari modificano il proprio stato da fluido a gelatinoso quando le temperature si abbassano (Zeron Y. et al., 2001). Spesso questi cambiamenti non sono reversibili e, al momento del riscaldamento, i componenti cellulari non sono riassemblati correttamente (Hammerstedt RH. et al., 1990). Viste queste caratteristiche, la cosa migliore da fare per limitare i danni nel congelamento sembra essere quella di eliminare la transizione dalla fase fluida a quella gelatinosa, oppure fare in modo che questa avvenga a temperature più basse o molto rapidamente, utilizzando alte velocità di raffreddamento. Così come per le proprietà osmotiche, anche la tendenza al cambiamento di fase delle membrane durante il congelamento è altamente dipendente dalla loro composizione (Rottem S. et al., 1973). Alla luce di ciò, si può quindi affermare che la congelabilità delle cellule potrebbe essere migliorata intervenendo, dove possibile, sulla composizione delle membrane, ad esempio aggiungendo colesterolo per aumentare il rapporto tra colesterolo e fosfolipidi, oppure aggiungendo stabilizzatori di membrana come il trealosio.

Tutte queste osservazioni hanno indotto molti ricercatori a focalizzare la propria attenzione su questo aspetto e, come conseguenza di ciò, si

è riusciti ad ottenere dei risultati migliori anche in quelle specie in cui i successi nel congelamento sono sempre stati limitati. Ad esempio nel maiale la delipidizzazione o la crioconservazione degli embrioni ad uno stadio in cui il contenuto lipidico è più basso ha permesso di incrementare l'efficienza del congelamento (Nagashima H. et al. 1994; Dobrinsky JR. et al., 2000). Il contenuto e la composizione lipidica intracellulare sono molto importanti; infatti, è stato dimostrato che embrioni suini dopo delipidizzazione microchirurgica sono più resistenti al congelamento e, quindi, che la riduzione del contenuto lipidico intracitoplasmatico consente di migliorare le procedure di congelamento embrionale. Anche la migliore congelabilità degli embrioni prodotti in vivo rispetto a quelli ottenuti in vitro sembra essere connessa con la composizione lipidica di membrana (Abd El Razek et al., 2000).

E' stato dimostrato che, variando, ad esempio, il contenuto lipidico degli embrioni, e modificando quindi le condizioni di coltura, anche la congelabilità delle cellule ne viene influenzata. Una dimostrazione di ciò è stata data dallo studio di Abe H. et al. che ha confermato che la coltura in assenza di siero diminuisce l'accumulo dei lipidi e, quindi, migliora la criotolleranza degli embrioni bovini (Abe H. et al., 2002). Anche se questi maggiori successi sono sicuramente correlati alla

modificazione del contenuto lipidico citoplasmatico, il meccanismo specifico con cui ciò avviene non è ancora chiaro.

Sebbene la rimozione del siero dai media di coltura abbia diminuito chiaramente l'accumulo di lipidi citoplasmatici, gli embrioni prodotti in vitro con albumina sierica bovina (priva di acidi grassi) o albumina sierica ricombinante umana hanno, comunque, più lipidi dei controlli in vivo (De La Torre-Sanchez JF. et al., in press). Barcelo-Fimbres e Seidel (dati non pubblicati) hanno condotto una serie di esperimenti per abbassare ulteriormente il contenuto lipidico, dimostrando che ciò è possibile utilizzando la fenazina etosolfato (PES). Questo composto agisce ossidando l'NADPH che è richiesto per la sintesi di numerosi lipidi. Quindi non solo è stato possibile migliorare la crioconservazione di embrioni prodotti in vitro eliminando il siero di sangue dai media di coltura, ma è stato possibile incrementare ancora di più questi risultati modificando il metabolismo degli embrioni stessi.

Le condizioni in cui gli embrioni in vitro sono tenuti influiscono sulla sensibilità al congelamento degli embrioni nei vari stadi. Infatti, condizioni di coltura non ottimali possono determinare la produzione di embrioni con un nodo embrionale più piccolo, la qual cosa rappresenta un altro fattore che influisce negativamente sulla criotolleranza (Iwasaki et al., 1990; Leibo and Loskutoff, 1993). Da diversi studi è emerso, inoltre, che la morfologia da sola non è

sufficiente per definire la qualità embrionale, e analisi più approfondite sul numero totale delle cellule e della ICM (inner cell mass) sono fondamentali per valutare l'efficienza di un sistema di coltura in grado di produrre embrioni di buona qualità e quindi più criotolleranti.

Altri fattori che influenzano l'efficienza della crioconservazione sono la composizione e la temperatura di incubazione (4°C o temperatura ambiente) dei diversi media (PBS, TCM, SOF) sia al congelamento che allo scongelamento.

Per quanto riguarda lo stadio di sviluppo e la specie, questi due fattori sono strettamente connessi l'uno all'altra. La loro influenza sulla congelabilità degli embrioni è di fondamentale rilievo per cui risulta opportuno trattare separatamente delle diverse specie, e all'interno di ognuna di esse dei diversi stadi di sviluppo embrionale, per meglio comprendere i problemi e le possibili soluzioni che si possono avere nelle procedure di crioconservazione.

## ***Influenza della specie e dello stadio di sviluppo sulla congelabilità embrionale***

### **Embrioni bovini**

Il primo successo di crioconservazione in questa specie si ebbe nel 1973 quando Wilmut and Rowson riportarono la prima gravidanza da embrioni bovini congelati e scongelati mediante congelamento lento (Wilmut I. e Rowson LEA. 1973). Bisogna invece aspettare il 1997 per avere i primi esperimenti di vitrificazione di embrioni bovini (Van Wagtendonk-de Leeuw AM. Et al., 1997); questi successi hanno suggerito un possibile uso di tale tecnica in alternativa al metodo tradizionale del congelamento lento. Da questo studio è emersa la possibilità di vitrificare con successo embrioni bovini prodotti in vivo senza avere una significativa riduzione della percentuale di gravidanza rispetto agli embrioni trasferiti freschi (44.5 % vs 45.1 % rispettivamente). Al contrario gli embrioni bovini prodotti in vitro hanno subito mostrato una maggiore sensibilità alla crioconservazione, e questo ha spinto molti ricercatori a concentrare i propri studi in questa direzione. Ciò ha consentito di evidenziare le differenze ultrastrutturali esistenti tra embrioni prodotti in vivo e quelli prodotti in vitro dopo crioconservazione. Studi approfonditi hanno dimostrato

che gli embrioni prodotti in vivo sono caratterizzati da un sottile spazio perivitellino (PvS), da un rivestimento di microvilli (MV) continuo e compatto lungo tutta la membrana plasmatica, da un sistema ben definito di interazioni cellula-cellula e da un'ampia popolazione mitocondriale con numerose creste trasverse. La sola esposizione di questi embrioni alle soluzioni contenenti i CP hanno causato una profonda disidratazione cellulare e un rigonfiamento dei mitocondri. In più, la crioconservazione ha indotto ulteriori danni a carico dei MV e l'accumulo di detriti cellulari. Per quanto riguarda gli embrioni prodotti in vitro, questi sono caratterizzati da un PvS più ampio, da pochi MV, dalla presenza di detriti cellulari nel PvS, da un numero ridotto di contatti tra le cellule del trofoblasto e da una maggiore presenza di gocce lipidiche citoplasmatiche. Quando esposti a soluzioni contenenti i CP, gli embrioni prodotti in vitro reagiscono allo stesso modo di quelli prodotti in vivo, ma risulta evidente una maggiore sensibilità dei primi rispetto a questi ultimi. Infatti, quelli prodotti in vitro, quando crioconservati, perdono la loro struttura organizzativa che nel caso di quelli prodotti in vivo risulta molto più capace di riorganizzarsi dopo lo scongelamento. E' stato ampiamente dimostrato che queste profonde differenze sono da imputare alle modalità di coltura che si hanno 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 risultano ancora significativamente inferiori quando si trasferiscono embrioni prodotti in vitro vs embrioni prodotti in vivo (Pugh PA. Et al., 2000; Sommerfeld V. e Niemann H. 1999).

In altri studi è stata paragonata la capacità di sviluppo in vitro di embrioni bovini vitrificati ed embrioni congelati; O'Kearney-Flynn et al. 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 %). (O'Kearney-Flynn M. et al., 1998). Esperimenti di congelamento rapido di embrioni bovini hanno evidenziato una sopravvivenza più bassa (33.3 %) rispetto al congelamento lento e alla vitrificazione (Niemann H. 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 (giorno 0= fecondazione) di coltura 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. Nello stesso lavoro è

stata riportata la nascita di tre vitelli dal trasferimento di blastocisti vitrificate e riscaldate che, a loro volta, erano state ottenute dalla fecondazione di oociti vitrificati e riscaldati. Lo stesso autore aveva precedentemente riportato risultati simili vitrificando embrioni prodotti in vitro, a diversi stadi di sviluppo, utilizzando le French mini-straw. In particolare da questo studio era emerso un'alta percentuale di riespansione dopo riscaldamento di blastocisti precoci (75 %), blastocisti (80 %), blastocisti espanse (83 %) e blastocisti sgusciate (67 %), mentre la stessa percentuale risultava molto bassa per le morulae compatte (10 %). Inoltre, nello stesso lavoro è stato riportato una maggiore percentuale di sgusciamiento per gli embrioni allo stadio più avanzato (blastocisti, 47 %; e blastocisti espanse, 63 %) rispetto a quello precoce (blastocisti precoci, 34 %) (Vajta G. et al., 1996). Nel 2006, Vieira A.D. et al. hanno utilizzato la metodica delle OPS apportando alcune modifiche; hanno sostituito le OPS con micropipette di vetro tirate al calore, vitrificando con successo blastocisti espanse di bovino (Vieira A.D. et al., in press). Recentemente, è stato dimostrato che embrioni bovini allo stadio di blastocisti sgusciate, prodotte dopo nuclear transfer, sono relativamente resistenti quando sottoposti a procedure di vitrificazione che utilizzano come strumento il cryotop (Laowtammathron C. et al, 2005).

## **Embrioni ovini e caprini**

Embrioni di pecora sono stati usati come modello di studio per il congelamento/scongelo di embrioni bovini con i metodi tradizionali in cui veniva usato DMSO come CP (Willadsen, 1977), ma così come nel bovino l'EG è risultato migliore (McGinnis et al., 1993). Numerosi sono stati i successi ottenuti nella crioconservazione di embrioni ovini, con produzione di nati a termine. Nel 1995 Songsasen et al. (Songsasen N. et al., 1995) hanno riportato il 36 % di gravidanze dopo il trasferimento di blastocisti di pecora congelate al giorno 6 usando EG come crioprotettore. Cocero et al. (Cocero M.J. et al., 1996) hanno ottenuto percentuali simili di gravidanze a termine dopo congelamento/scongelo e trasferimento di morule e blastocisti. Nel 1996, Naitana et al. hanno dimostrato che lo stadio di sviluppo influenza la vitalità in vitro di embrioni ovini manipolati e vitrificati; da questo studio è emerso che gli embrioni più avanzati nello sviluppo resistono meglio rispetto agli stadi più precoci, e che una temporanea coltura in vitro, dopo la manipolazione e prima della vitrificazione, ne migliora la sopravvivenza (Naitana S. et al., 1996).

Successi nella vitrificazione di embrioni di pecora sono stati ottenuti sia con embrioni prodotti in vitro che in vivo (Martinez AG. e Matkovic M. 1998). Tuttavia anche in questa specie si osserva una riduzione della percentuale di gravidanza dopo trasferimento di embrioni

vitrificati/riscaldati prodotti in vitro vs in vivo. Già però nel 1990 sono state riportate percentuali di gravidanza simili da embrioni caprini trasferiti dopo congelamento/scongelo e da embrioni di controllo trasferiti freschi (59 % vs 60 %, rispettivamente) (Li R. et al., 1990). Di recente, Baril et al. (Baril G. et al., 2001), sono riusciti a migliorare sensibilmente le percentuali di gravidanza nella pecora modificando le tecniche di vitrificazione usate per la crioconservazione di embrioni prodotti in vivo. Nel 1999, Traldi et al. (Traldi AS. et al., 1999) hanno mostrato che embrioni di capra prodotti in vitro sono in grado di sopravvivere alla crioconservazione e sostenere lo sviluppo a termine dopo ET. Dal confronto tra embrioni di capra e pecora prodotti in vitro è emerso che la sopravvivenza dopo vitrificazione risulta del 60 % per i primi e solo del 41 % per i secondi, così come diversa è risultata la percentuale di gravidanza: 45 % per embrioni di capra e 15 % per quelli di pecora.

### **Embrioni equini**

Il primo puledro nato dal trasferimento di un embrione equino crioconservato mediante congelamento lento è stato ottenuto da Yamamoto et al. nel 1982 (Yamamoto Y. et al., 1982). In questo studio è stata dimostrata la possibilità di congelare, utilizzando il glicerolo come CP, blastocisti precoci ottenute da flushing uterino effettuato a

sei giorni dall'ovulazione, ma non blastocisti espanse (giorno 8). Slade et al., nel 1985 (Slade NP. et al.,1985), hanno ottenuto risultati soddisfacenti dal congelamento di blastocisti con un diametro inferiore ai 200  $\mu$ M, ma hanno riportato percentuali di gravidanza molto basse dopo il trasferimento di blastocisti espanse congelate/scongelate; in quest'ultimo caso è stato ipotizzato che la causa dell'insuccesso fosse dovuto ad una bassa permeabilità del CP durante la fase di scongelamento. In particolare, gli autori hanno supposto che all'origine di questo risultato negativo ci sia la differente permeabilità degli embrioni equini ai CP, in funzione del loro stadio di sviluppo, attribuibile alla capsula che si forma a circa sei giorni dall'ovulazione e che s'ispessisce successivamente; questa capsula è uno strato acellulare che si trova sotto la zona pellucida ed è formato da una glicoproteina simile alla mucina con caratteristiche sovrapponibili a quelle della zona mucillaginoso del coniglio (Oriol JG. et al., 1993). Ciò dimostra che il fattore più critico per la sopravvivenza degli embrioni equini dopo congelamento/scongelamento è rappresentato dalle dimensioni dell'embrione e dal suo stadio di sviluppo (Squires et al., 1999).

Rispetto ai vari studi effettuati sulla crioconservazione mediante congelamento lento, non esistono molte esperienze sull'applicazione della tecnica di vitrificazione ad embrioni equini. Hochi et al., nel 1994

(Hochi S. et al., 1994), hanno valutato la capacità di sviluppo in vivo di embrioni precedentemente vitrificati, ottenendo due gravidanze dal trasferimento di cinque embrioni. Nel 1995 è stata valutata la vitalità in vitro di blastocisti equine di diametro inferiore e superiore a 300  $\mu\text{m}$ , vitrificate con il 40 % di EG e il 18 % di Ficoll, ed è stato dimostrato che embrioni di diametro superiore a 300  $\mu\text{m}$  subiscono danni maggiori durante la procedura di crioconservazione, anche quando si ricorre alla tecnica di vitrificazione (Hochi S. et al., 1995). Un'altra esperienza, per valutare l'efficienza di diversi metodi di vitrificazione su embrioni equini, è stata condotta da Oberstain et al. (Oberstein N. et al., 2001). Da questo studio è risultata un'efficienza di vitrificazione simile per tutte le metodiche impiegate: le OPS, il CLV e il tradizionale congelamento lento non hanno dato differenze significative nella crioconservazione di blastocisti equine precoci. Più di recente, Caracciolo di Brienza e colleghi (Caracciolo di Brienza V. et al., 2004) hanno riportato 4 gravidanze dopo il trasferimento di sei embrioni (diametro <300  $\mu\text{m}$ ) vitrificati usando 3.4M di glicerolo e 4.6M di glicole etilenico. In un altro studio, Moussa M. et al. (Moussa M. et al., 2005) hanno dimostrato che la vitrificazione di embrioni equini mediante le OPS ha un'efficienza simile rispetto a quella ottenuta con il congelamento lento.

## **Embrioni suini**

A differenza delle altre specie i primi progressi nella ricerca sulla crioconservazione di embrioni suini, che hanno portato alla produzione di nati a termine, risalgono solo al 1997.

La crioconservazione degli embrioni suini è stata fortemente limitata dall'estrema sensibilità di questi a temperature inferiori ai 15 °C, la qual cosa impedisce di applicare i metodi tradizionali di congelamento lento. Tra i fattori che influenzano la sopravvivenza al congelamento dopo vitrificazione di embrioni suini ci sono: lo stadio di sviluppo embrionale (Dobrinsky J.R. 2001); la tossicità dei CP (Weber PK et al. 1994); la composizione delle soluzioni di vitrificazione (Berthelot F. et al. 2000; Dobrinsky JR 1997); le velocità di raffreddamento/riscaldamento (Arav A. et al. 2002) e le condizioni di coltura in cui l'embrione si sviluppa. E' stato, infatti, osservato che embrioni semplicemente raffreddati a 15 o 20 °C possono stabilire gravidanze dopo trasferimento chirurgico, a differenza di embrioni raffreddati a 5 o 10 °C (Wilmut I. 1972). L'influenza dello stadio di sviluppo sulla resistenza al congelamento sembra dovuto al più alto contenuto lipidico che si trova negli stadi più precoci rispetto alle blastocisti; infatti Dobrinsky et al. nel 1994 hanno dimostrato che morule suine di 5 giorni non sopravvivono alla crioconservazione, mentre blastocisti espanse al sesto giorno e blastocisti sgusciate al

settimo sono in grado di sopravvivere e continuare lo sviluppo in vitro dopo vitrificazione/riscaldamento.

Per questo motivo, sono state sviluppate nuove tecnologie per crioconservare embrioni suini allo stadio di blastocisti sgusciate e ciò ha portato alla prima nascita al mondo di suinetti dopo crioconservazione mediante vitrificazione (Dobrinsky JR. et al., 2000).

Anche se il metodo delle OPS è stato introdotto da Vajta et al. nel 1997, è stato solo nel 2000 che Berthelot et al. hanno ottenuto le prime nascite dopo l'applicazione di questa nuova metodologia nella specie suina (Berthelot F. et al., 2000).

Visto che la maggiore difficoltà nel crioconservare embrioni suini sembra attribuibile, in larga parte, all'alto contenuto lipidico presente nel citoplasma, sono state fatte molte ricerche per comprendere come questa caratteristica influenzi la sensibilità e la sopravvivenza al freddo. Nagashima et al. (Nagashima H. et al., 1994; Nagashima H. et al., 1995) hanno dimostrato che rimuovendo i lipidi da embrioni di 2-8 cellule, mediante centrifugazione e micromanipolazione e raffreddandoli o crioconservandoli, più della metà degli embrioni delipidizzati erano in grado di sopravvivere alla crioconservazione rispetto a nessuno del gruppo controllo. Suinetti normali sono stati così ottenuti e questa è stata la prima dimostrazione che embrioni precoci possono sopravvivere alla crioconservazione in seguito alla

delipidizzazione e che, evidentemente, la perdita di lipidi citoplasmatici viene compensata nel corso del successivo sviluppo.

Altro problema che si riscontra nella crioconservazione di embrioni suini è il danno citoscheletrico. A questo proposito, Dobrinsky et al., nel 2000 (Dobrinsky JR. et al., 2000), hanno utilizzato per la prima volta la citocalasina B come stabilizzatore del citoscheletro per prevenire, durante il congelamento, la distruzione dei microfilamenti e della membrana plasmatica.

Recentemente, Cuello et al. (2004) hanno usato diversi metodi di congelamento ultra-rapido per vitrificare embrioni suini: il metodo delle OPS, quello delle SOPS e il Vit-Master-OPS. In questo lavoro è stato dimostrato che le diverse percentuali di sopravvivenza e sgusciamento di embrioni non sono influenzate dal metodo usato e, quindi, dall'aumento della velocità di raffreddamento al di sopra di 20000 °C/min (OPS). Di conseguenza, l'opportunità di usare velocità maggiori di raffreddamento, senza incorrere in diminuzioni della sopravvivenza post-riscaldamento, comporta la possibilità di utilizzare concentrazioni di CP più basse e, quindi, potenzialmente meno tossiche. Inoltre, nello stesso lavoro, è stato dimostrato un effetto dello stadio di sviluppo embrionale sulla vitrificazione con tutti e tre i metodi usati. Infatti, la più alta percentuale di sviluppo in vitro è stata ottenuta con le blastocisti espanse, percentuale che non è risultata

differente da quella ottenuta con blastocisti espanse fresche, mentre lo stadio di morulae ha mostrato la percentuale di sopravvivenza e sgusciamento più bassa dopo il riscaldamento, sia rispetto agli altri stadi vitrificati con lo stesso metodo, che rispetto a morule fresche.

### **Embrioni micromanipolati**

Dato l'affermarsi di tecniche di micromanipolazione cellulare, quali lo splitting, la biopsia per la genotipizzazione o la determinazione del sesso, il nuclear transfer e l'iniezione intracitoplasmatica di sperma (ICSI), si rende sempre più necessario lo sviluppo di procedure di congelamento grazie alle quali si possano ottenere buoni risultati anche nel caso di embrioni micromanipolati. I primi vitelli nati dal congelamento/scongelo di semi-embriani furono riportati da Lehn-Jensen e Willadsen nel 1983. In questo studio morule bovine precoci, al giorno 5 e 6, sono state sezionate, incluse in agar e poi trasferite in ovidutto di pecora legato, per lo sviluppo fino allo stadio di blastocisti, stadio in cui sono state sottoposte a congelamento lento. Il 70 % dei semi-embriani sono sopravvissuti al congelamento/scongelo e il 61 % degli embriani trasferiti in riceventi sincronizzate hanno dato gravidanze a termine. Nonostante questi successi e l'alta vitalità dei semi-embriani crioconservati, questa procedura non risulta molto pratica. Inoltre, sebbene siano stati

sviluppati vari protocolli più semplici per la crioconservazione di semi-embriani, la sopravvivenza post-scongelo non è stata così alta (Bielanski A. e Hare WCD. 1988), soprattutto nel caso degli embriani prodotti in vitro.

La particolare sensibilità alla crioconservazione degli embriani micromanipolati, si pensa sia dovuta ad una parziale distruzione delle cellule e della zona pellucida. Se si tiene conto, infatti, che nella bisezione gli embriani subiscono una perdita cellulare approssimativa del 10 % (Skryszowska M. e Smorag M. 1989) e che una simile proporzione di cellule è di solito danneggiata durante la crioconservazione (Low BG. et al., 1986) si può facilmente comprendere il motivo di questi scarsi risultati. Visto che la perdita cellulare può essere ridotta utilizzando tecniche di manipolazione migliori, la maggior parte delle ricerche sono state dirette alla risoluzione dei danni a livello della zona pellucida. L'integrità di quest'ultima, infatti, risulta fondamentale ai fini della sopravvivenza, come dimostrato dai migliori risultati ottenuti ricorrendo, per il congelamento di semiembriani, ad una ZP surrogata (Niemann H. et al., 1986), alla riparazione delle soluzioni di continuo con frammenti di agar (Tsunoda Y. et al., 1987) o alla microincapsulazione in membrane di arginato di polilisina (Hollingsworth TS. e Page RD. 1988). Comunque, studi effettuati su semi-embriani bovini freschi non hanno

evidenziato differenze nelle percentuali di gravidanza rispetto a embrioni senza zona pellucida, embrioni inseriti in una zona pellucida surrogata o inclusi in agar (Warfield SJ. et al., 1987). L'importanza della zona pellucida nella crioconservazione di embrioni micromanipolati non è ancora chiara, in quanto altri autori hanno riportato dati contrastanti in merito (Picard L. et al., 1988). E' opportuno sottolineare che l'applicazione di procedure di trasferimento diretto di semi-embriani potrebbe favorire l'avanzamento della crioconservazione e l'uso di embrioni micromanipolati.

Dal congelamento di embrioni, sottoposti a biopsia per la determinazione del sesso, sono state ottenute percentuali di sopravvivenza in vitro dopo lo scongelamento del 35.4 % (Gustafsson H. et al., 1994) e percentuali di gravidanza comprese tra il 41 e il 63 % (Herr CM. e Reed KC. 1991). Da tutti questi studi si evince che la rimozione di un piccolo numero di cellule per il sessoingio o, più in generale, la manipolazione, come, ad esempio, la microiniezione genica, sembra influire negativamente sulla sopravvivenza dopo procedure di congelamento/ scongelamento in misura inferiore rispetto all'embryo splitting.

Per quanto riguarda la crioconservazione di embrioni bovini clonati esistono, allo stato attuale, pochi lavori. Le percentuali di gravidanza ottenute dal trasferimento di embrioni clonati, congelati in

glicerolo e reidratati gradualmente prima dell'ET, o congelati in EG e trasferiti direttamente, sono state rispettivamente del 22 e 24 % (Voelkel SA. e Hu YX. 1992), percentuali simili a quelle riportate dal trasferimento di embrioni clonati freschi (23.4 %) (Bondioli KR. et al., 1990).

### **Embrioni bufalini**

Nel caso della specie bufalina esistono pochissime informazioni in merito alla crioconservazione di embrioni. Il principale problema di questa specie è la scarsa resistenza al congelamento degli embrioni prodotti in vitro, verosimilmente imputabile all'elevato contenuto lipidico (Boni R. et al., 1992), che limita fortemente la diffusione in campo della tecnologia OPU-IVEP. Nel 1998 Galli et al. (Galli C. et al., 1998) sono riusciti ad ottenere tre vitelli dal trasferimento di nove embrioni crioconservati effettuando la coltura in vivo, nelle tube di pecora, di zigoti previamente maturati e fecondati in vitro, dimostrando che la permanenza nell'ovidutto incrementa la resistenza al congelamento; in questo caso oociti prelevati con OPU sono stati fertilizzati in vitro e a due giorni dall'TVF sono stati trasferiti in ovidutto di pecora, prima di essere crioconservati mediante congelamento lento.

Embrioni bufalini interamente prodotti in vitro sono stati vitrificati con risultati soddisfacenti per la prima volta nel 1996 con una metodica previamente utilizzata nella specie ovina (Naitana S. et al., 1996). In questo esperimento la percentuale di sopravvivenza, dopo coltura in vitro, valutata in base al ripristino di una normale morfologia e alla riespansione della blastocoele, è stata del 65 % (Neglia G. et al., 2001) e non è stata riscontrata nessuna differenza tra i vari stadi di sviluppo considerati, mentre è stato dimostrato che embrioni che si sviluppano precocemente resistono meglio alla vitrificazione rispetto a quelli più tardivi. Infatti la sopravvivenza a 48h è risultata significativamente differente tra embrioni vitrificati al giorno 6 e 7 di coltura (66.6 % e 53.7 %, rispettivamente) e di embrioni vitrificati al giorno 8 (30.4 %). La nascita di vitelli bufalini dal trasferimento di embrioni vitrificati con le tradizionali paillette, applicando un metodo precedentemente descritto da Kasai et al. nel 1990 per la crioconservazione di embrioni di topo, è stata inoltre riportata da Duran et al. nel 2004 (Duran DH. et al., 2004). Anche in questa esperienza le percentuali di sopravvivenza post-riscaldamento non sono risultate differenti nei diversi stadi di sviluppo embrionale, e la percentuale dei nati è stata pari al 10.91 %, cioè 6 femmine riceventi su 55 hanno dato prole vitale. Per quanto riguarda l'uso del cryotop per la vitrificazione di embrioni bufalini, Laowtammathron C. et al. nel

2005 hanno utilizzato tale metodica unicamente su blastocisti sgusciate, prodotte dopo nuclear transfer, ottenendo una relativa resistenza di queste alla vitrificazione.

## **CAPITOLO 3**

### **PARTE SPERIMENTALE**

#### **SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo della presente tesi è stato quello di verificare la possibilità di crioconservare, mediante vitrificazione, embrioni di bufalo interamente prodotti in vitro. In particolare, ci si è proposti di valutare l'efficienza di diverse metodiche di vitrificazione: 1) vitrificazione mediante paillette tradizionali da inseminazione, 2) metodo delle Open Pulled Straw e 3) metodo Cryotop.

Prima di passare alla analisi dei singoli esperimenti, è opportuno riportare in maniera dettagliata l'intera metodica della produzione embrionale in vitro comune a tutti gli esperimenti.

# **PRODUZIONE EMBRIONALE IN VITRO**

## **MATERIALI E METODI**

### ***a) Recupero degli oociti***

Le ovaie di bufala sono state prelevate in sede di macellazione e messe in soluzione fisiologica antibiotata con 150 mg/L di kanamicina a 30-35°C; il trasporto in laboratorio è stato fatto entro 3-4 ore dall'avvenuta macellazione. In laboratorio, i complessi cumulo-oocita (COC) sono stati recuperati mediante aspirazione dei follicoli del diametro di 2-8 mm, utilizzando un ago di 18 G connesso ad una pompa di aspirazione, operante a pressione negativa controllata (40-50 mm Hg). La raccolta dei COC è stata fatta sottoponendo il fluido follicolare aspirato a valutazione microscopica, a seguito della quale è stata eseguita la loro valutazione morfologica e selezione: solo i COC di grado A e B (Boni R. et al., 1996), caratterizzati da cumulo compatto e non atresico e citoplasma omogeneo, sono stati utilizzati per la fase sperimentale.

### ***b) Maturazione In Vitro (IVM)***

Per la maturazione in vitro degli oociti si è utilizzato un terreno commerciale, il TCM 199 tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio ed addizionato di siero fetale di vitello (FCS) al 10 %, 0.2 mM di piruvato di sodio, 0.5 µg/ml di FSH, 5 µg/ml di LH, 1 µg/ml di 17β-estradiolo, 50 µM di cisteamina e 50 µg/ml di kanamicina. I COC selezionati sono stati sottoposti ad abbondante lavaggio in TCM 199 tamponato con 15 mM di HEPES e 5 mM di bicarbonato di sodio (H199) e addizionato del 10 % di FCS, e come ultimo passaggio lavati nel terreno finale di maturazione, e posti in gocce di 50 µl (10 COC/goccia) dello stesso medium, coperte di olio minerale. La IVM è stata effettuata alla temperatura di 38.5°C, in atmosfera gassosa controllata con il 5 % di CO<sub>2</sub> in aria umidificata, per una durata di 22 ore.

### ***c) Fecondazione In Vitro (IVF)***

Gli spermatozoi per la fecondazione in vitro sono stati ottenuti da seme congelato/scongelato di un toro precedentemente testato per la IVF. Il seme è stato trattato mediante la metodica dello swim-up per 1 ora, utilizzando il medium Ham's. Il pellet ottenuto dopo centrifugazione del surnatante è stato risospeso in modo da ottenere una concentrazione finale di 2x10<sup>6</sup>/ml nel terreno di fecondazione,

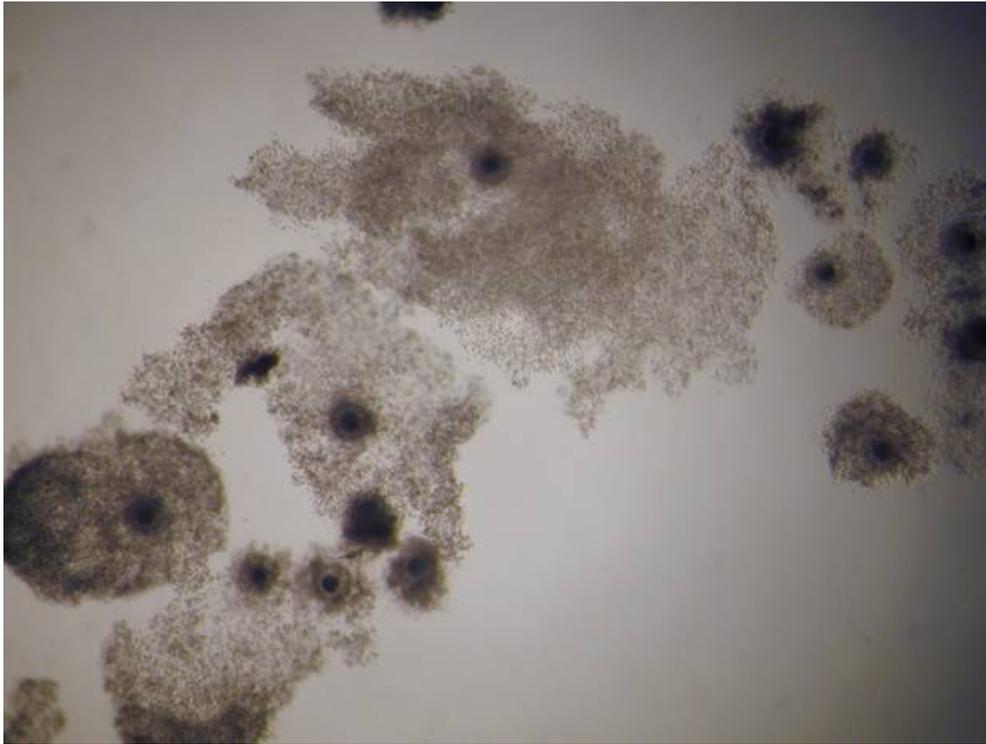
costituito dal medium Tyrode Albumine Lactate Pyruvate (Lu KH. et al., 1987) addizionato di 0.2 mM di penicillamina, 0.1 mM di ipotaurina e 0.01 mM di eparina. La fecondazione è stata effettuata in gocce di 50 µl (5 oociti/goccia), coperte da olio minerale, a 38.5°C, in presenza del 5 % di CO<sub>2</sub> in aria umidificata per una durata di 20-22 ore.

#### ***d) Coltura In Vitro (IVC)***

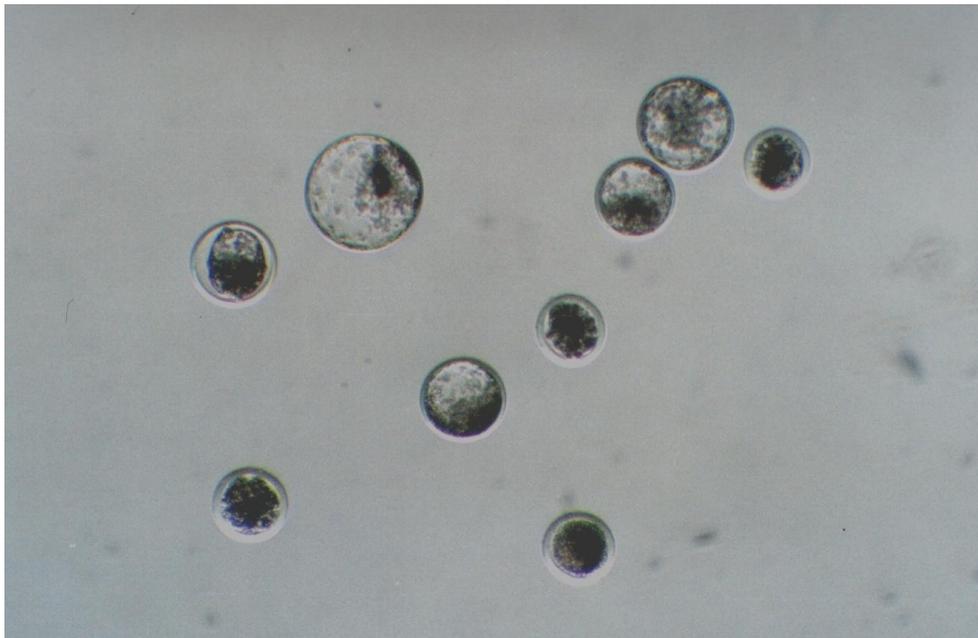
Circa 24 ore dopo la IVF, i presunti zigoti sono stati rimossi dal medium di fecondazione, lavati 2 volte in medium SOF Hepes-tamponato e distribuiti in gocce di 20 µl di SOF tamponato con bicarbonato di sodio (Tervit HR. et al., 1972). La coltura in vitro è stata effettuata in camere modulari a tenuta, nelle quali è stata insufflata una miscela gassosa con il 5 % di CO<sub>2</sub>, il 7 % di O<sub>2</sub> e l' 88 % di N<sub>2</sub>, alla temperatura di 38.5°C.

La valutazione del cleavage, ovvero della percentuale di embrioni divisi a 2 cellule, è stata effettuata al giorno 5 di coltura (giorno 0 = giorno dell'IVF). Gli oociti indivisi sono stati eliminati dalle piastre, mentre gli embrioni sono stati trasferiti in terreno fresco per altri due giorni. La resa embrionale, intesa come percentuale di morule compatte (TM), blastocisti precoci (eBl), blastocisti (Bl), blastocisti espanse (xBl) e blastocisti sgusciate (hBl), è stata valutata al giorno 7.

**Figura 2.** Gruppo di oociti maturi di bufalo.



**Figura 3.** Gruppo di embrioni bufalini a vari stadi di sviluppo al settimo giorno di coltura.



## **ESPERIMENTO 1**

### **VITRIFICAZIONE DI EMBRIONI DI BUFALO MEDIANTE L'UTILIZZO DELLE TRADIZIONALI PAILLETTE DA INSEMINAZIONE**

Questo primo esperimento è diviso in due parti: la prima riguarda la vitrificazione di embrioni prodotti in vitro a partire da oociti prelevati da ovaie da macello e per questi embrioni la valutazione della vitalità post-riscaldamento è stata fatta sulla base della sopravvivenza in vitro; la seconda riguarda embrioni prodotti in vitro a partire da oociti prelevati mediante tecnica OPU e per questi embrioni la vitalità post-riscaldamento è stata valutata sulle percentuali di gravidanze ottenute dopo trasferimento embrionale (ET) in femmine riceventi opportunamente sincronizzate.

## **Esperimento 1.1**

### **EFFETTO DELLA VITRIFICAZIONE IN PAILLETTE SULLA SOPRAVVIVENZA EMBRIONALE DOPO CULTURA IN VITRO**

#### **Premessa e scopo del lavoro**

La possibilità di crioconservare embrioni di bufalo prodotti in vitro mediante una tecnica di vitrificazione, precedentemente utilizzata per vitrificare embrioni di pecora (Naitana et al., 1996), è stata già riportata, nel 2001, con una buona efficienza in termini di sopravvivenza in vitro post-riscaldamento (Neglia et al., 2001). Da allora notevoli sono stati i progressi ottenuti con il sistema IVEP (Gasparrini B. et al., 2003) e, visto che la qualità embrionale è fondamentale ai fini del successo della crioconservazione, si è ipotizzato che il miglioramento del sistema IVEP potesse essere associato ad una maggiore tolleranza degli embrioni alla vitrificazione. Lo scopo di questo primo esperimento è stato, quindi, di valutare se la produzione in vitro di embrioni di migliore qualità fosse effettivamente associata ad una maggiore resistenza degli stessi al congelamento.

## **Materiali e Metodi**

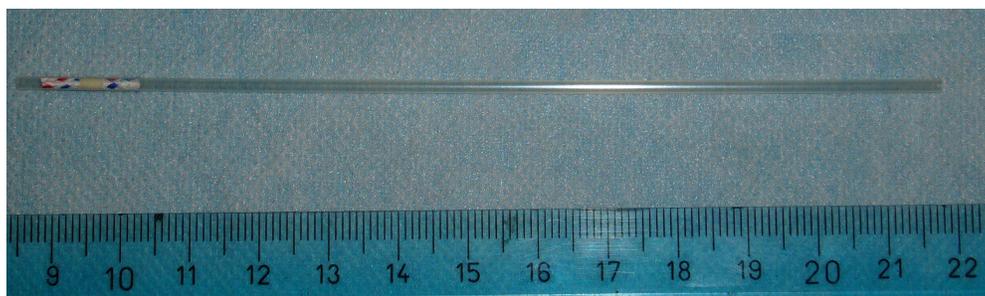
Le soluzioni di vitrificazione sono state preparate usando una soluzione base (SB) di PBS a cui sono stati aggiunti 0.3 mM di sodio piruvato, 3.3 mM di glucosio e 20 %(v/v) di FCS. Gli embrioni sono stati vitrificati utilizzando la stessa metodica precedentemente da Neglia et al. nel 2001. Embrioni di bufalo prodotti in vitro, a partire da ovaie da macello, sono stati valutati al giorno 7 di coltura, divisi per stadi di sviluppo (TM = 59; eBl = 38; Bl = 48; xBl = 41; hBl = 59) e sottoposti a vitrificazione. L'esperimento è stato ripetuto 22 volte.

### ***Fase di vitrificazione***

1. Dopo lavaggio in un terreno tamponato, per eliminare i residui di olio minerale derivanti dalle gocce di coltura, gli embrioni sono stati incubati singolarmente in gocce da 200 µl di una soluzione di 1.4 M di glicerolo (G) in SB (SV1) per 5 minuti;
2. successivamente, gli embrioni sono stati trasferiti in gocce da 200 µl di una seconda soluzione (SV2) composta da 1.4 M di G e 3.6 M di glicole etilenico (GE) in SB per ulteriori 5 minuti;
3. a questo punto, gli embrioni, mediante una pipetta a bocca, sono stati spostati, nel minor volume possibile, in gocce da 25 µl di una soluzione di 3.4 M di G e 4.6 M di GE in SB (SV3) per pochi secondi;

4. gli embrioni sono stati, quindi, caricati al centro di una paillette da inseminazione da 0.25 ml (figura 4), previamente etichettata con la data e lo stadio embrionale; la colonna di circa 25  $\mu$ l contenente gli embrioni è stata separata con due bolle di aria da due colonne, una a monte e una a valle, di circa 90  $\mu$ l di una soluzione di 0.5 M di saccarosio (SV4 =soluzione di scongelamento), per evitare che nei vari passaggi la SV3 e la SV4 venissero a contatto tra loro;
5. la paillette è stata poi sigillata e preraffreddata su vapori d'azoto per 1 minuto, prima di essere immersa in LN<sub>2</sub> per lo stoccaggio. Il tempo di incubazione nella SV3 non ha superato i 25-30 secondi.

**Figura 4.** Paillette da inseminazione da 0.25 ml.



***Fase di riscaldamento:***

1. La paillette, stoccata in LN<sub>2</sub>, è stata prelevata dal cestello, tenuta a temperatura ambiente per 15 secondi e poi immersa in un bagno riscaldato a 20°C per altri 15 secondi;

2. la paillette, asciugata e disinfettata con etanolo al 70 %, è stata tagliata all'estremità sigillata ed il contenuto è stato svuotato in una piastra petri da 3.5 mm di diametro e agitato gentilmente, utilizzando una micropipetta, per facilitare la miscelazione delle due soluzioni contenute nella paillette, SV3 e SV4, tale da consentire agli embrioni di venire a contatto con la SV4;

3. gli embrioni sono stati poi prelevati dalla piastrina petri, mediante una pipetta a bocca, e trasferiti in una goccia di 500  $\mu$ l di una soluzione di scongelamento contenente 0.25 M di saccarosio per 5 minuti;

4. successivamente gli embrioni sono stati lavati due volte in circa 2.5 ml di medium SOF Hepar-tamponato, e trasferiti in gocce di 20  $\mu$ l di SOF tamponato con bicarbonato di sodio. Le piastrine con le gocce contenenti gli embrioni sono state poi messe in camere modulari a tenuta, nelle quali è stata insufflata una miscela gassosa con il 5 % di CO<sub>2</sub>, il 7 % di O<sub>2</sub> e l' 88 % di N<sub>2</sub>, alla temperatura di 38.5°C.

Entrambe le procedure di vitrificazione e di riscaldamento sono state eseguite a temperatura ambiente e i terreni utilizzati sono stati tenuti a temperatura ambiente per circa 1h prima dell'utilizzo.

### ***Criteria di valutazione post-riscaldamento***

Dopo 24 e 48h dal riscaldamento è stata valutata la vitalità embrionale basandosi sulla riespansione della blastocite e sulla ripresa di una normale morfologia embrionale. Gli embrioni sono stati classificati come embrioni di grado 1 (eccellente), 2 (buono) e 3 (scadente); nei primi due gradi rientrano gli embrioni considerati idonei al trasferimento in femmine riceventi, mentre al grado 3 appartengono quegli embrioni che sono sopravvissuti alla vitrificazione, ma che non vengono presi in considerazione per un eventuale trasferimento.

### **Analisi Statistica**

Le sopravvivenze post-riscaldamento sono state analizzate mediante il test del chi-quadro.

## Risultati

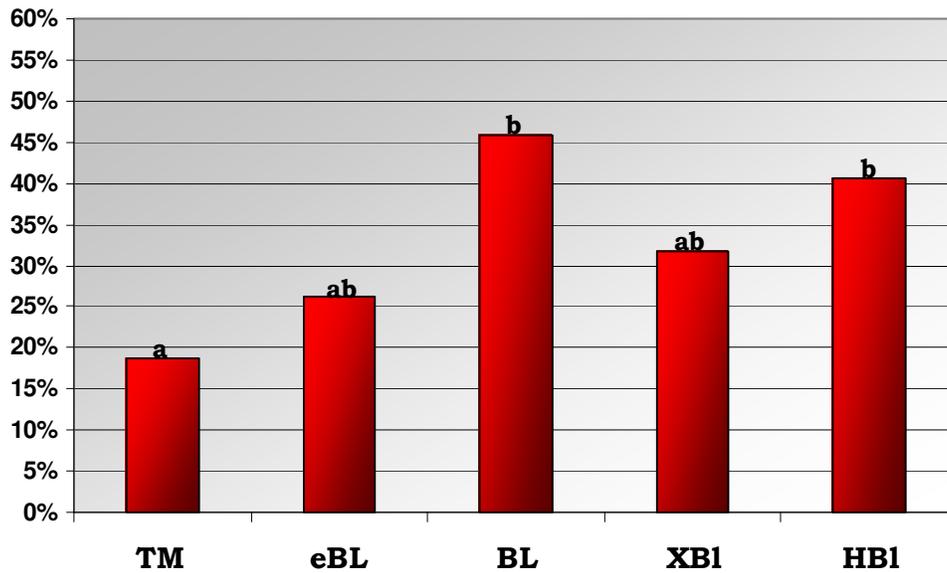
La percentuale di sopravvivenza ottenuta sul totale degli embrioni (grado 1, 2 e 3), indipendentemente dallo stadio di sviluppo da essi raggiunto, è stata del 56 e 41 % rispettivamente dopo 24 e 48h di coltura. La percentuale di sopravvivenza ottenuta valutando solo gli embrioni trasferibili (grado 1 e 2) è stata, invece, del 33 e del 19 % rispettivamente a 24 e 48h.

Da questo esperimento è emerso che lo stadio embrionale influisce sulla sopravvivenza in vitro. Infatti, come si osserva dal grafico 1, dopo 24h di coltura post-riscaldamento, se si considerano gli embrioni di grado 1 e 2, le TM hanno mostrato una percentuale di sopravvivenza significativamente inferiore rispetto a quella delle Bl e delle hBl (19 vs 46 e 41 %, rispettivamente;  $P < 0.05$ ), mentre non è stata osservata nessuna differenza tra gli altri stadi considerati (26, 46, 32 e 41 %, rispettivamente per eBl, Bl, xBl e hBl). Se, invece, si va a considerare solo la sopravvivenza degli embrioni di grado 1, questi risultati cambiano notevolmente; infatti, così come mostrato nel grafico 2, risulta evidente che le Bl hanno presentato una sopravvivenza nettamente superiore rispetto a tutti gli altri stadi (25 vs 2, 5, 7 e 8 % rispettivamente per le Bl, le TM, le eBl, le xBl e le hBl;  $P < 0.05$ ). Un'analisi più approfondita delle percentuali di sopravvivenza a 24h

degli embrioni trasferibili, ha evidenziato che ben il 52.2 % (12/23) del totale degli embrioni di grado 1 è dato dalle sole Bl, che risultano, quindi, lo stadio più criotollerante. Infatti, la percentuale di Bl di grado 1 è stata significativamente maggiore rispetto a quella delle TM e delle hBl (54 vs 9 e 21 %;  $P < 0.05$ ) e rispetto a quella delle xBl (54 vs 23 %;  $P = 0.07$ ) e delle eBl (54 vs 20 %;  $P = 0.08$ ), sebbene in questi ultimi casi sia stata osservata solo una tendenza alla significatività, dovuta forse al basso numero di casi. L'importanza di questo risultato è stata confermata dalla sopravvivenza a 48h, risultata significativamente maggiore per le Bl rispetto a tutti gli altri stadi, sia quando si considerano gli embrioni di grado 1 e 2 (grafico 3), che solo quelli di grado 1 (grafico 4). In particolare, la sopravvivenza (grado 1 e 2) delle Bl è risultata significativamente maggiore rispetto a quella delle TM (42 vs 2 %;  $P < 0.01$ ) e rispetto a quella delle eBl, delle xBl e delle hBl (42 vs 10, 19 e 24 % rispettivamente;  $P < 0.05$ ); è stato inoltre osservato che lo stadio di TM ha presentato una minore sopravvivenza ( $P < 0.05$ ) rispetto a tutti gli stadi ad eccezione delle eBl. Per quanto riguarda gli embrioni di grado 1, la sopravvivenza delle Bl è stata diversa all' 1 % rispetto alle TM e alle hBl (19 vs 2 e 3 % rispettivamente) e al 5 % rispetto alle eBl e alle xBl (19 vs 3 e 5 % rispettivamente). Analogamente a quanto osservato a 24h, anche a 48h, quando si confrontano le sopravvivenze degli embrioni di grado 1, emerge che il 60 % (9/15) di questi è

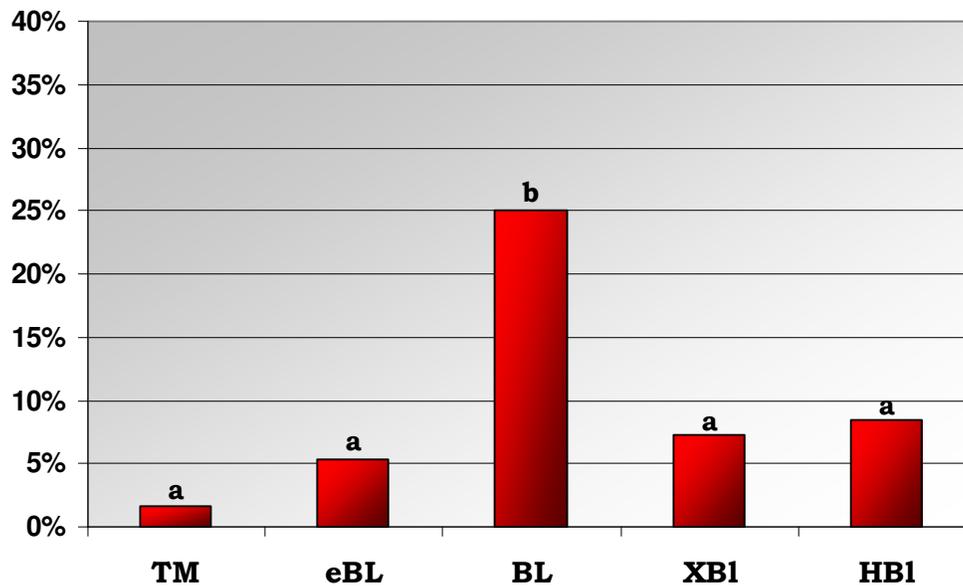
rappresentato dalle B1. Un'ulteriore conferma della migliore congelabilità delle B1 è emersa dalla più elevata percentuale di vivi a 48h, calcolata sul totale dei sopravvissuti a 24h (tabella I).

**Grafico 1.** Sopravvivenza di embrioni di grado 1+2 dopo 24h di coltura post-riscaldamento.



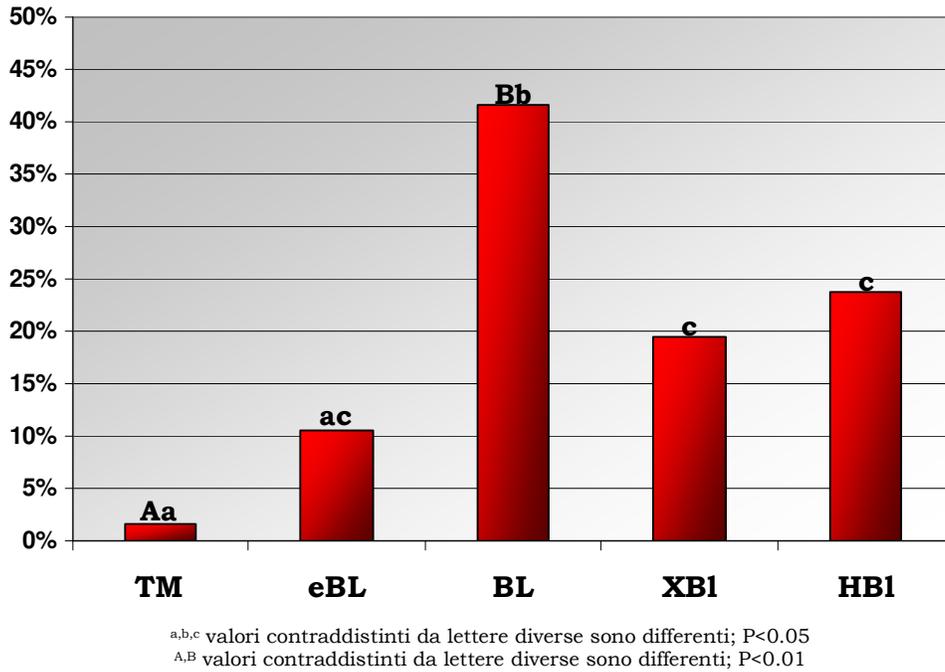
a,b valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$

**Grafico 2.** Sopravvivenza di embrioni di grado 1 dopo 24h di coltura post-riscaldamento.

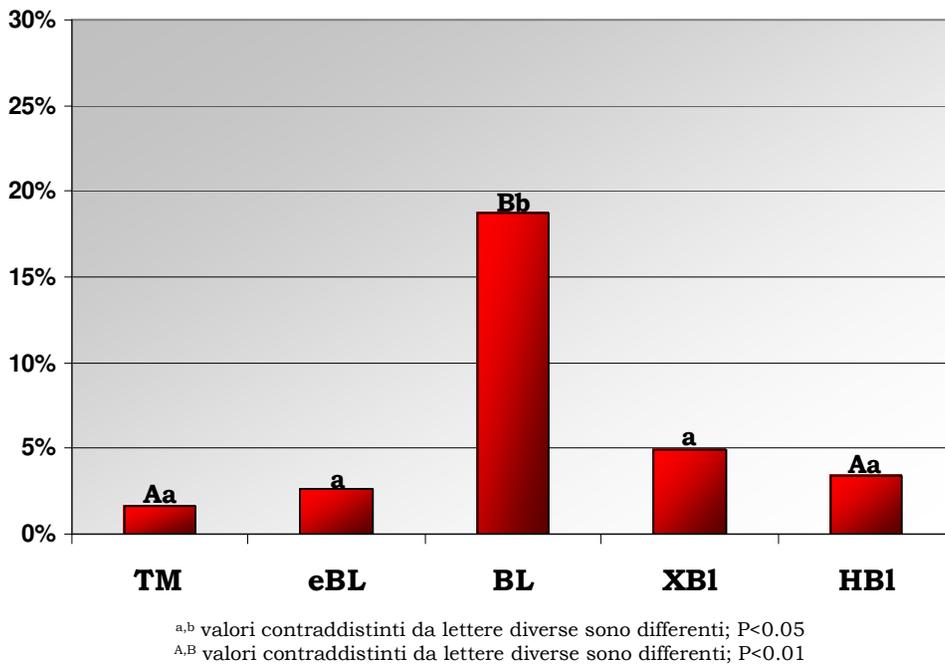


a,b valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$

**Grafico 3.** Sopravvivenza di embrioni di grado 1+2 dopo 48h di coltura post-riscaldamento.



**Grafico 4.** Sopravvivenza di embrioni di grado 1 dopo 48h di coltura post-riscaldamento.



**Tabella I.** Tasso di sopravvivenza degli embrioni di grado 1+2 nei diversi stadi embrionali tra 24 e 48h di coltura post-riscaldamento.

<b>Stadio embrionale</b>	<b>Vivi a 24h di grado 1+2</b>	<b>Vivi a 48h di grado 1+2</b>	<b>Tasso di sopravvivenza (%)</b>
<b>TM</b>	11	1	1/11 (9)
<b>eBl</b>	10	4	4/10 (40)
<b>Bl</b>	22	20	20/22 (91)
<b>xBl</b>	13	8	8/13 (62)
<b>hBl</b>	24	14	14/24 (58)

## **Esperimento 1.2**

### **EFFETTO DELLA VITRIFICAZIONE IN PAILLETTE SULLE PERCENTUALI DI GRAVIDANZA DOPO TRASFERIMENTO IN ANIMALI RICEVENTI**

#### **Premessa e scopo del lavoro**

L'uso della tecnica OPU, associata con la produzione embrionale in vitro, rappresenta una valida procedura per il recupero di oociti in vivo da animali noti, e permette di ottenere un gran numero di embrioni (Galli et al. 2001); infatti, la raccolta di oociti mediante OPU viene eseguita con successo in molte specie animali, sia su soggetti prepuberi che adulti (Galli et al. 2001). Nella specie bufalina, a causa della limitata risposta ai trattamenti di SO, la combinazione di queste due tecniche sembra essere il metodo migliore per accelerare il progresso genetico per via materna (Galli et al. 2001, Neglia et al. 2003). Fino ad ora, nella specie bufalina, sono state ottenute gravidanze con embrioni prodotti in vitro e trasferiti freschi. Nel 1991 Madan et al. (Madan et al. 1991) hanno riportato la nascita del primo vitello bufalino dopo il trasferimento di blastocisti fresche, ottenute dopo IVM, IVF e IVC in cocoltura con cellule di ovidutto. Utilizzando lo stesso metodo, sono stati prodotti in India, nel 1994, altri quattro

vitelli dal trasferimento di blastocisti fresche ottenute in vitro (Madan et al. 1994). Nel 1997, Boni et al. (Boni et al 1997), hanno riportato due gravidanze dal trasferimento di morule fresche, prodotte con l'uso della tecnica OPU associata all'IVEP. Solo nel 1998, Galli et al. hanno ottenuto tre vitelli bufalini dopo trasferimento di 9 embrioni, ottenuti da oociti maturati e fecondati in vitro, ma coltivati in un ospite intermedio, con l'uso della metodica tradizionale di congelamento lento (Galli et al., 1998). In uno studio più recente è stata riportata una percentuale di gravidanza del 16.4 % dopo trasferimento di embrioni vitrificati con una soluzione di GE al 40 % (v/v), ficoll al 18 % (p/v) e saccarosio 0.3 M (Duran et al 2004).

Visti gli incoraggianti risultati ottenuti in vitro in seguito alla vitrificazione di embrioni IVP, a partire da ovaie da macello, è stato deciso di verificare le percentuali di gravidanza ottenibili dopo il trasferimento in animali riceventi di embrioni vitrificati con questa metodica. In questo caso, per motivi sanitari, non è stato possibile utilizzare ovaie da macello e si è proceduto, quindi al prelievo degli oociti a partire da animali in vivo mediante tecnica OPU.

## **Materiali e Metodi**

### ***Ovum pick-up e produzione embrionale in vitro***

La prova è stata condotta su 12 bufale pluripare in lattazione. Gli animali sono stati sottoposti a OPU due volte a settimana per sette sessioni. L'Ovum Pick-up è stato effettuato utilizzando una sonda ecografica da 5 MHz (SSD-500, Aloka CO., Tokyo), montata su uno speciale supporto, ed inserita in vagina. L'aspirazione è stata effettuata usando un ago, inserito in un'apposita guida, della lunghezza di 55 cm e del calibro di 17 Gauge. L'ago è stato connesso, mediante una pompa di aspirazione da vuoto (K-MAR-5100, Cook IVF Co., Australia), ad una provetta sterile da 15 ml in cui veniva raccolto il liquido follicolare contenente gli oociti. Una pressione costante di - 40 mm di mercurio è stata mantenuta per tutta la durata del prelievo e, durante l'aspirazione, il tubicino di raccolta è stato continuamente lavato con TCM 199 tamponato con 25 mM di hepes e supplementato con 1000 U.I./ml di eparina e il 10 % di FCS.

Tutti i follicoli antrali visibili sono stati aspirati. Ciascun follicolo punto è stato registrato in una delle tre classi morfometriche individuate:

1. Piccoli:  $\emptyset < 5$  mm;
2. Medi:  $\emptyset 5 - 10$  mm;

3. Grandi:  $\varnothing > 10$  mm.

Durante l'aspirazione la provetta è stata mantenuta ad una temperatura di 37-38° C per evitare di danneggiare i gameti raccolti. La provetta di ciascun animale è stata contrassegnata per poter effettuare, separatamente per ciascun soggetto, le successive fasi.

I COC sono stati recuperati, nel più breve tempo possibile, subito dopo aver filtrato il liquido follicolare e si è proceduto immediatamente alla loro classificazione secondo i criteri già menzionati. I COC sono stati poi messi in TCM 199 tamponato con 25 mM di HEPES addizionato con 0.5 µg/ml di FSH, 5 µg/ml di LH, 1 µg/ml di 17β-estradiolo, 50 µM di cisteamina, 10 % di FCS e 50 µg/ml di kanamicina (Gasparrini et al. 2000) in un incubatore portatile a 38.5° C portati in laboratorio in 4-6 ore. Nel laboratorio, i COC sono stati trasferiti in gocce da 50µl di terreno finale di maturazione (TCM 199 tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio ed addizionato di FCS al 10 %, 0.2 mM di piruvato di sodio, 0.5 µg/ml di FSH, 5 µg/ml di LH, 1 µg/ml di 17β-estradiolo, 50 µM di cisteamina e 50 µg/ml di kanamicina) coperte di olio minerale. La IVM è stata effettuata alla temperatura di 38.5°C, in atmosfera gassosa controllata con il 5 % di CO<sub>2</sub> in aria umidificata, per una durata di 22 ore. Le successive fasi di IVF e IVC sono state effettuate così come precedentemente descritto per gli oociti prelevati da ovaie da macello.

### ***Vitrificazione, riscaldamento e trasferimento embrionale (ET)***

Dopo la valutazione al 7° giorno di coltura, gli embrioni sono stati separati in due gruppi omogenei prima del trasferimento in animali riceventi opportunamente sincronizzati (doppia iniezione di PGF<sub>2α</sub> a 12 giorni di distanza). Nel primo, in cui gli embrioni (N= 7) sono stati trasferiti freschi, gli stessi sono stati messi in SOF, caricati in paillette da ET e posti in vacutainer all'interno dei quali è stata insufflata la miscela gassosa usata nell'IVC (5 % di CO<sub>2</sub>, il 7 % di O<sub>2</sub> e l' 88 % di N<sub>2</sub>) e trasportati in azienda in un incubatore portatile alla temperatura di 38.5°C. Nel secondo gruppo, gli embrioni (N= 8) sono stati vitrificati con la stessa procedura riportata per l'esperimento 1.1. Per quanto riguarda la procedura di riscaldamento, questa è stata eseguita come precedentemente descritto fino al punto 3, dopodiché gli embrioni riscaldati sono stati lavati in PBS addizionato con il 10 % di FCS e caricati in paillette da ET. Le diagnosi di gravidanza sono state fatte a 45 e 120 giorni dal trasferimento mediante palpazione rettale.

## Risultati

Nessuna gravidanza è stata ottenuta dal trasferimento di embrioni freschi, mentre tre gravidanze (37.5 %) sono state accertate a 45 e confermate a 120 giorni dopo il trasferimento degli embrioni vitrificati/riscaldati. Sfortunatamente una gravidanza si è interrotta a 180 giorni, mentre le altre due sono esitate nella nascita di due vitelli bufalini da embrioni vitrificati interamente prodotti in vitro, risultandone una percentuale di gravidanze a termine del 25 %.

**Figura 5** Vitelli bufalini ottenuti dopo trasferimento di embrioni IVP vitrificati e riscaldati.



## ***ESPERIMENTO 2***

### **VITRIFICAZIONE DI EMBRIONI DI BUFALO MEDIANTE IL METODO DELLE OPEN PULLED STRAW (OPS)**

#### **Premessa e scopo del lavoro**

Sulla base delle nostre conoscenze, l'uso delle OPS (figura 6) per vitrificare embrioni di bufalo non è mai stato riportato prima. Dopo gli incoraggianti risultati ottenuti nell'esperimento precedente, e visti i recenti successi riportati da molti autori, in altre specie, con l'uso di nuove metodiche che sfruttano il principio dei volumi minimi di soluzione di vitrificazione per la crioconservazione degli embrioni, abbiamo voluto verificare se l'uso delle OPS potesse incrementare la sopravvivenza in vitro anche di embrioni di bufalo IVP. Per la pianificazione sperimentale ci si è basati sul lavoro di Vajta et al. sulla vitrificazione di embrioni bovini con le OPS (Vajta et al., 1998). Visto che gli unici dati a nostra disposizione riguardanti la vitrificazione degli embrioni di bufalo IVP sono quelli riportati da Neglia et al. del 2001, si è ritenuto interessante effettuare un confronto tra il protocollo di Vajta e quello da noi utilizzato nell'esperimento 1, in modo da capire se un eventuale miglioramento fosse imputabile al solo uso dei volumi minimi di soluzione vitrificante, e quindi allo strumento impiegato per

la vitrificazione (OPS), oppure al diverso protocollo (diversa composizione dei terreni e diversi tempi di esposizione).

**Figura 6.** Open Pulled Straw



## **Materiali e Metodi**

Al giorno 7 di coltura embrioni morfologicamente intatti, a diversi stadi di sviluppo, sono stati selezionati e divisi in due gruppi sperimentali: gruppo 1, in cui è stato usato il protocollo di Vajta e gruppo 2, in cui è stato impiegato lo stesso protocollo dell'esperimento 1. Il confronto tra i gruppi è stato replicato 25 volte.

### **GRUPPO 1**

Tutti i media di vitrificazione sono stati preparati a partire da una soluzione base (SB) di TCM-199 Hepes-tamponato supplementato con il 20 % di FCS; i media sono stati riscaldati a circa 37 °C per almeno 1h prima di essere utilizzati e tutta la procedura di vitrificazione è stata fatta usando un tavolino riscaldato a 37 °C. Per questo gruppo sperimentale è stato utilizzato come protocollo di vitrificazione e riscaldamento quello precedentemente impiegato da Vajta per vitrificare embrioni di bovino (Vajta G. et al., 1998), modificato nella sola fase di coltura in cui è stato utilizzato SOFaa con 8 mg/ml di BSA.

Embrioni di bufalo prodotti in vitro, a partire da ovaie da macello, sono stati valutati al giorno 7 di coltura e divisi per stadi di sviluppo (TM =20; eBl =37; Bl =40; xBl =43; hBl =56).

### ***Fase di vitrificazione***

1. Dopo lavaggio in un terreno tamponato, per eliminare i residui di olio minerale derivanti dalle gocce di coltura, gli embrioni sono stati incubati singolarmente in gocce da 200  $\mu$ l di soluzione base contenente 7.5 % di DMSO e 7.5 % di GE (SV1) per 3 minuti;
2. gli embrioni sono stati poi trasferiti nel minor volume possibile, mediante una pipetta a bocca, in gocce da 20  $\mu$ l della soluzione finale di vitrificazione (SV2) costituita da 0.5 M di saccarosio in SB contenente 16.5 % di DMSO e 16.5 % di GE per pochi secondi;
3. gli embrioni sono stati presi in un volume di 1.5  $\mu$ l, messi al centro di una piastra petri, e caricati per capillarità in una OPS che è stata immediatamente immersa in LN<sub>2</sub> e stoccata; gli embrioni sono stati esposti alla SV2 per una durata massima di 20-25 secondi.

### ***Fase di riscaldamento***

1. La OPS è stata prelevata dall'azoto liquido e l'estremità più sottile contenente l'embrione è stata immediatamente immersa in circa 1ml di una soluzione di saccarosio 0.25 M in SB per 1 minuto;
2. gli embrioni sono stati poi trasferiti per 5 minuti in una seconda soluzione di riscaldamento, costituita da 0.15 M di saccarosio in SB;
3. gli embrioni sono stati successivamente lavati due volte in medium SOF Hepes-tamponato, e trasferiti in gocce di 20  $\mu$ l di SOF

tamponato con bicarbonato di sodio. Le piastrine con le gocce contenenti gli embrioni sono state poi messe in camere modulari a tenuta, nelle quali è stata insufflata una miscela gassosa con il 5 % di CO<sub>2</sub>, il 7 % di O<sub>2</sub> e l' 88 % di N<sub>2</sub>, alla temperatura di 38.5°C.

## **GRUPPO 2**

In questo secondo gruppo sono stati utilizzati i media di vitrificazione/riscaldamento dell'esperimento 1 e il protocollo dello stesso esperimento 1 è stato adattato in maniera da usare le OPS come strumento di vitrificazione. Le soluzioni di vitrificazione sono state preparate usando una soluzione base (SB) di PBS a cui sono stati aggiunti 0.3 mM di sodio piruvato, 3.3 mM di glucosio e 20 % (v/v) di FCS.

Embrioni di bufalo prodotti in vitro, a partire da ovaie da macello, sono stati valutati al giorno 7 di coltura e divisi per stadi di sviluppo (TM =16; eBl =35; Bl =43; xBl =41; hBl =55).

### ***Fase di vitrificazione***

1. Dopo lavaggio in un terreno tamponato, per eliminare i residui di olio minerale derivanti dalle gocce di coltura, gli embrioni sono stati incubati singolarmente in gocce da 200 µl di una soluzione di 1.4 M di G in SB (SV1) per 5 minuti;
2. successivamente, gli embrioni sono stati trasferiti in gocce da 200 µl di una seconda soluzione (SV2) composta da 1.4 M di G e 3.6 M di GE in SB per ulteriori 5 minuti;

3. gli embrioni, mediante una pipetta a bocca, sono stati spostati nel minor volume possibile in gocce da 25  $\mu$ l di una soluzione di 3.4 M di G e 4.6 M di GE in SB (SV3) per pochi secondi;
4. immediatamente, gli embrioni sono stati presi in un volume di 1.5  $\mu$ l della SV3, messi al centro di una piastra petri, e caricati per capillarità in una OPS che è stata immediatamente immersa in LN<sub>2</sub> e stoccata. Dal momento in cui gli embrioni sono stati esposti alla SV3 all'immersione in LN<sub>2</sub> sono trascorsi 20-25 secondi.

### ***Fase di riscaldamento***

1. La OPS è stata prelevata dall'azoto liquido e l'estremità più sottile contenente l'embrione è stata immediatamente immersa in circa 1ml di una soluzione 0.5M di saccarosio in SB per circa 15-20 secondi;
2. gli embrioni sono stati successivamente incubati per 5 minuti in una seconda soluzione di riscaldamento allo 0.25 M di saccarosio in SB;
3. gli embrioni sono poi stati lavati due volte in medium SOF Hepes-tamponato, e trasferiti in gocce di 20  $\mu$ l di SOF tamponato con bicarbonato di sodio. Le piastrine con le gocce contenenti gli embrioni sono state poi messe in camere modulari a tenuta, nelle quali è stata insufflata una miscela gassosa con il 5 % di CO<sub>2</sub>, il 7 % di O<sub>2</sub> e l' 88 % di N<sub>2</sub>, alla temperatura di 38.5°C.

Per entrambi i gruppi 1 e 2, dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento è stata valutata la vitalità embrionale basandosi sulla riespansione della blastocite e sulla ripresa di una normale morfologia embrionale.

### **Analisi Statistica**

Le sopravvivenze post-riscaldamento sono state analizzate mediante il test del chi-quadro e, quando il numero dei casi lo ha richiesto, è stato eseguito il test esatto di Fisher.

## **Risultati**

Nessuna delle TM vitrificate nei due gruppi è sopravvissuta e quindi di seguito non verranno riportati risultati relativi a questo stadio embrionale.

### **Gruppo 1**

All'interno del gruppo sperimentale 1, i risultati relativi alla sopravvivenza degli embrioni di grado 1 e 2, come mostrato nel grafico 5, indicano che non ci sono differenze tra i vari stadi considerati sia a 24h (46, 52, 37 e 34 % rispettivamente per eBl, Bl, xBl e hBl), sia a 48h (32, 32, 33 e 27 % rispettivamente per eBl, Bl, xBl e hBl). Andando, però, ad analizzare la percentuale di sopravvivenza dei soli embrioni di grado 1 sul totale dei vitrificati, è emerso che le hBl hanno presentato percentuali di sopravvivenza maggiori rispetto alle eBl sia a 24h (20 vs 3 %;  $P < 0.05$ ), sia a 48h (20 vs 3 %;  $P < 0.05$ ), mentre le Bl e le xBl hanno dato percentuali di sopravvivenza intermedie (7 e 16 %, rispettivamente sia a 24 che a 48h), come illustrato nel grafico 6. Inoltre, esaminando solo i dati relativi agli embrioni trasferibili (grado 1 e 2,  $N = 73$ ), è possibile osservare che in questo gruppo sperimentale gli embrioni di grado 1 ( $N = 22$ ) sono rappresentati per la maggior parte dalle xBl ( $N = 7$ ) e dalle hBl ( $N = 11$ ), e che questi numeri si mantengono

invariati tra 24 e 48h (grafico 7). In particolare, a 24h, la percentuale di embrioni di grado 1 sui totali trasferibili è risultata maggiore ( $P < 0.05$ ) per lo stadio di hBl rispetto a quello di eBl e di Bl, ma uguale alle xBl (58, 6, 14 e 44 %); le xBl, invece, hanno mostrato una migliore ( $P < 0.05$ ) sopravvivenza rispetto alle eBl e una tendenza alla significatività rispetto alle Bl (44 vs 14 % rispettivamente;  $P = 0.067$ ), come illustrato nel grafico 8. Analogamente a quanto appena descritto, anche a 48h le hBl hanno presentato percentuali di sopravvivenza maggiori rispetto alle eBl ( $P < 0.01$ ) ed alle Bl ( $P < 0.05$ ), ma uguali a quelle delle xBl (73, 8, 23 e 50 % rispettivamente), mentre queste ultime hanno confermato la differenza rispetto alle eBl ( $P < 0.05$ ), ma non rispetto alle Bl (grafico 8).

## **Gruppo 2**

A differenza di quello che accade nel primo gruppo sperimentale, nel gruppo 2 emergono già delle differenze, tra i vari stadi, nella sopravvivenza di embrioni di grado 1 e 2, sia a 24 che a 48h. Come si può osservare nel grafico 9, a 24h, le xBl mostrano una percentuale di sopravvivenza maggiore ( $P < 0.01$ ) rispetto alle eBl ma uguale agli altri stadi (26, 53, 58 e 47 % rispettivamente per eBl, Bl, xBl e hBl), mentre le eBl sono risultate diverse, oltre che dalle xBl, anche dalle Bl (26 vs 53 %, rispettivamente;  $P < 0.05$ ), e hanno mostrato una tendenza alla significatività verso le hBl (26 vs 47 %, rispettivamente;  $P = 0.068$ ). A

48h, invece, è stato osservato che la percentuale di sopravvivenza delle eBl e delle Bl era inferiore ( $P < 0.01$ ) a quella delle xBl e delle hBl (6, 12, 58 e 42 % rispettivamente), come illustrato dal grafico 9. Osservando nel dettaglio la sopravvivenza solo degli embrioni di grado 1 sul totale degli embrioni vitrificati, a 24h è stata evidenziata una maggiore sopravvivenza delle xBl rispetto alle eBl ( $P < 0.01$ ) e alle Bl ( $P < 0.05$ ), ma non rispetto alle hBl (11, 23, 44 e 33 % rispettivamente per eBl, Bl, xBl e hBl); inoltre, la percentuale di sopravvivenza di queste ultime è risultata maggiore ( $P < 0.05$ ) rispetto a quella delle eBl. A 48h, le xBl sono state lo stadio di sviluppo che ha mostrato la migliore efficienza sia rispetto alle eBl e alle Bl ( $P < 0.01$ ) che alle hBl ( $P < 0.05$ ) (41 vs 3, 7 e 18 % rispettivamente); in più, è stata evidenziata una maggiore ( $P < 0.05$ ) percentuale di sopravvivenza delle hBl rispetto alle eBl e alle Bl (grafico 10).

Se andiamo ad esaminare il numero degli embrioni di grado 1, sul totale degli embrioni trasferibili ( $N = 50/82$ ), si può osservare che a 24h il contributo maggiore è dato dalle Bl, xBl e hBl, mentre a 48h questo equilibrio si sposta ancora di più verso gli stadi avanzati, così come accade nel gruppo sperimentale 1 (grafico 11A e B). Se, invece, andiamo ad analizzare le percentuali di sopravvivenza degli embrioni di grado 1 sul totale dei trasferibili, emerge un'unica differenza, a 24h, tra le Bl e le xBl (43 vs 75 %;  $P = 0.057$ ), come riportato nel grafico 12.

In realtà, il mancato riscontro di una significatività tra i valori di sopravvivenza tra gli stadi precoci e avanzati è molto probabilmente dovuta alla bassa numerosità dei casi presenti.

### ***Confronto tra il gruppo 1 ed il gruppo 2***

Visto che fino ad ora, dall'analisi delle sopravvivenze post-riscaldamento, è emerso un effetto dello stadio di sviluppo, si è ritenuto opportuno fare un confronto diretto tra i due gruppi, analizzando, oltre alla sopravvivenza embrionale totale, soprattutto la sopravvivenza dei singoli stadi tra i due gruppi.

Non sono emerse differenze significative nelle percentuali di sopravvivenza in toto (grado 1, 2 e 3) sia a 24h (57 vs 66 % rispettivamente nei gruppi 1 e 2), sia a 48h (49 vs 45 % rispettivamente nei gruppi 1 e 2).

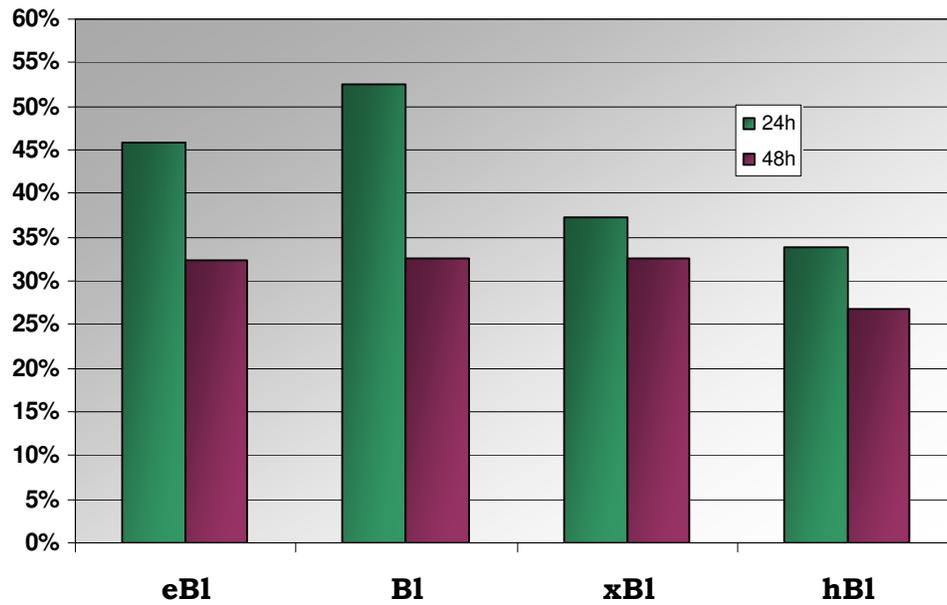
Da una prima analisi, fatta confrontando solo la sopravvivenza degli embrioni trasferibili sul totale, indipendentemente dallo stadio, non è emersa nessuna differenza sia a 24h (41 vs 47 % rispettivamente per il gruppo 1 e 2) sia a 48h (31 vs 31 % rispettivamente per il gruppo 1 e 2). Quando, però, abbiamo analizzato solo la percentuale degli embrioni di grado 1 calcolata sul totale degli embrioni trasferibili, è risultata evidente una differenza a favore del gruppo 2 a 24h (61 vs 30 %,  $P < 0.01$ ) ed una tendenza alla significatività a 48h (57 vs 41 %,  $P < 0.01$ ).

P=0.08), come mostrato nella tabella II. Nel grafico 13A e B è stata riportata la distribuzione numerica degli embrioni di grado 1 e 2 nei due gruppi. Il migliore risultato, ottenuto nel gruppo 2, è stato confermato anche quando si sono analizzate le percentuali di sopravvivenza di grado 1 sul totale degli embrioni vitrificati a 24h (29 vs 14 %, per il gruppo 2 e 1 rispettivamente;  $P<0.01$ ), mentre nessuna differenza è stata riscontrata a 48h.

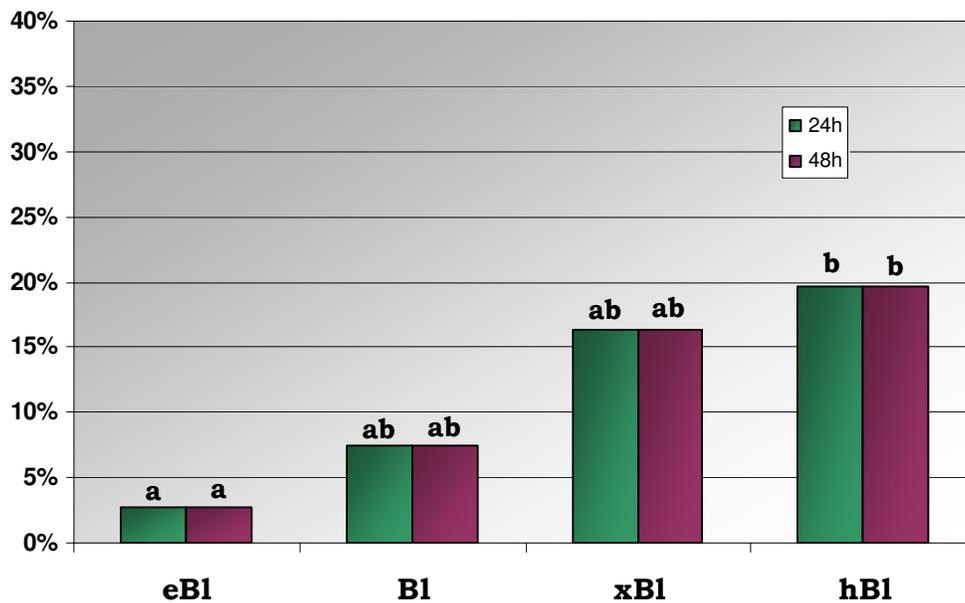
Quando l'effetto dei protocolli è stato confrontato sui singoli stadi embrionali, le percentuali di sopravvivenza degli embrioni di grado 1 e 2, a 24h, hanno mostrato una superiorità del gruppo 2 sul gruppo 1 unicamente per lo stadio di xB1 (58 vs 37 % rispettivamente;  $P=0.05$ ), mentre dal confronto delle eB1 è emersa una tendenza a favore del gruppo 1 ( $P=0.07$ ), come illustrato nel grafico 14. Quando sono stati considerati solo gli embrioni sopravvissuti di grado 1 sul totale dei vitrificati, è stata confermata una superiorità del gruppo 2 sul gruppo 1 per le xB1 (44 vs 16 % rispettivamente;  $P<0.01$ ); in più, a questa si è aggiunta anche quella per le B1 (23 vs 7 % rispettivamente per il gruppo 2 e 1;  $P<0.05$ ), come mostrato nel grafico 15. La migliore sopravvivenza degli embrioni vitrificati con il protocollo del gruppo 2, è stata dimostrata in maniera più evidente quando sono state considerate le percentuali degli embrioni di grado 1 sul totale degli embrioni trasferibili a 24h; infatti, come si osserva dal grafico 16, tutti

gli stadi sono risultati diversi tra i gruppi, ad eccezione dello stadio di hBl. Come si può osservare dal grafico 17, differenze nella sopravvivenza dei singoli stadi tra i due gruppi, sono emerse anche a 48h; infatti, la sopravvivenza di grado 1 e 2 delle xBl è risultata maggiore nel gruppo 2 rispetto al gruppo 1, mentre per gli stadi di eBl e di Bl i migliori risultati sono stati ottenuti nel gruppo 1. Analizzando la percentuale di embrioni di grado 1 sul totale degli embrioni vitrificati, è stata osservata una differenza per lo stadio di xBl (41 vs 16 % rispettivamente per il gruppo 2 e 1;  $P < 0.01$ ), come si evince dal grafico 18, confermando la superiorità del gruppo 2. Quando, però, le percentuali di sopravvivenza, a 48h, degli embrioni di grado 1 sono state valutate sul totale degli embrioni trasferibili, non è emersa nessuna differenza tra i due gruppi.

**Grafico 5.** Sopravvivenza embrionale di grado 1 e 2 dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 1.

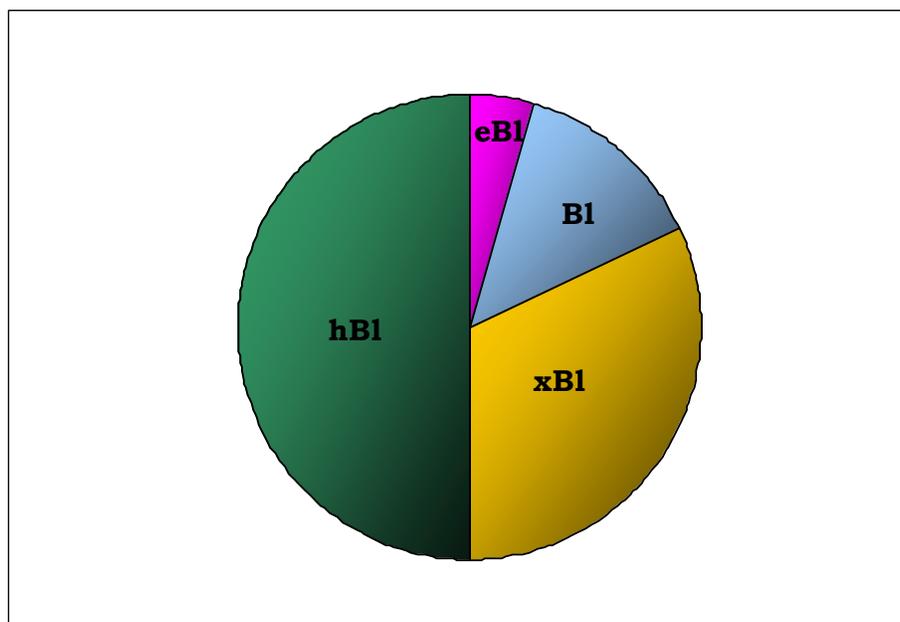


**Grafico 6.** Sopravvivenza embrionale di grado 1 sui vitrificati dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 1.

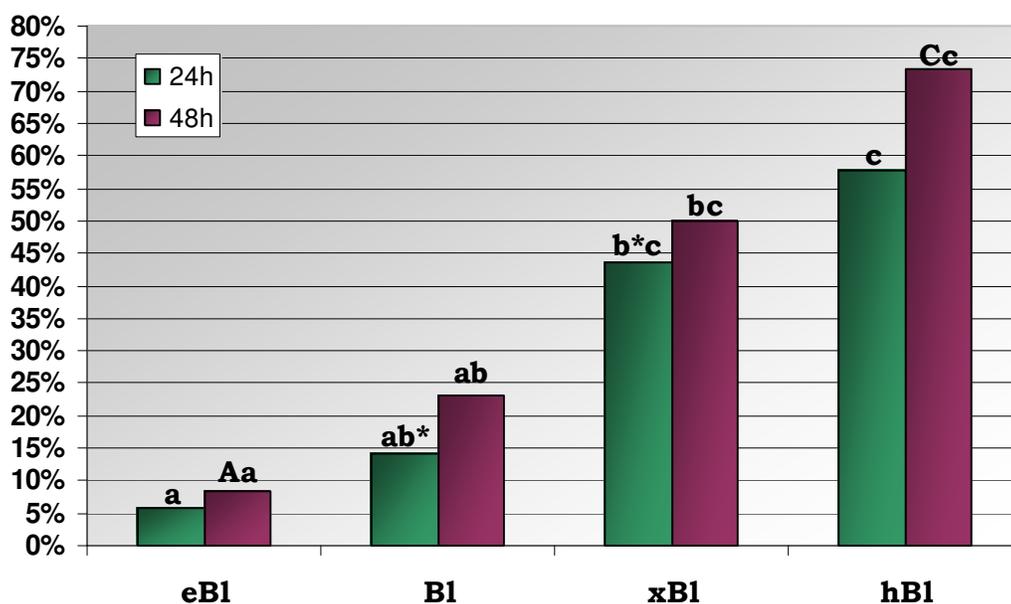


<sup>a,b</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.05

**Grafico 7.** Distribuzione dei diversi stadi embrionali sul totale degli embrioni di grado 1 a 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 1.

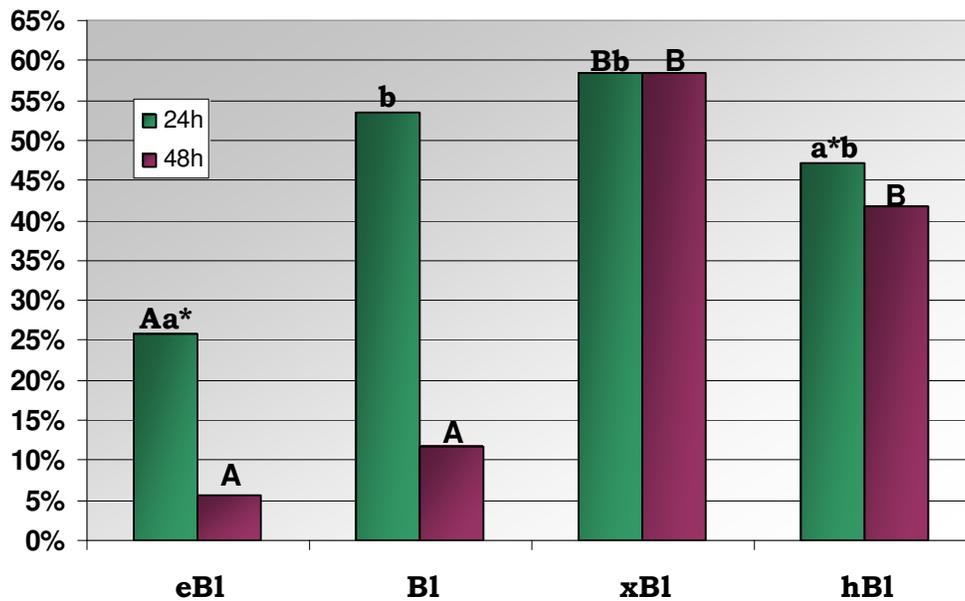


**Grafico 8.** Sopravvivenza embrionale di grado 1 rispetto agli embrioni trasferibili dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 1.



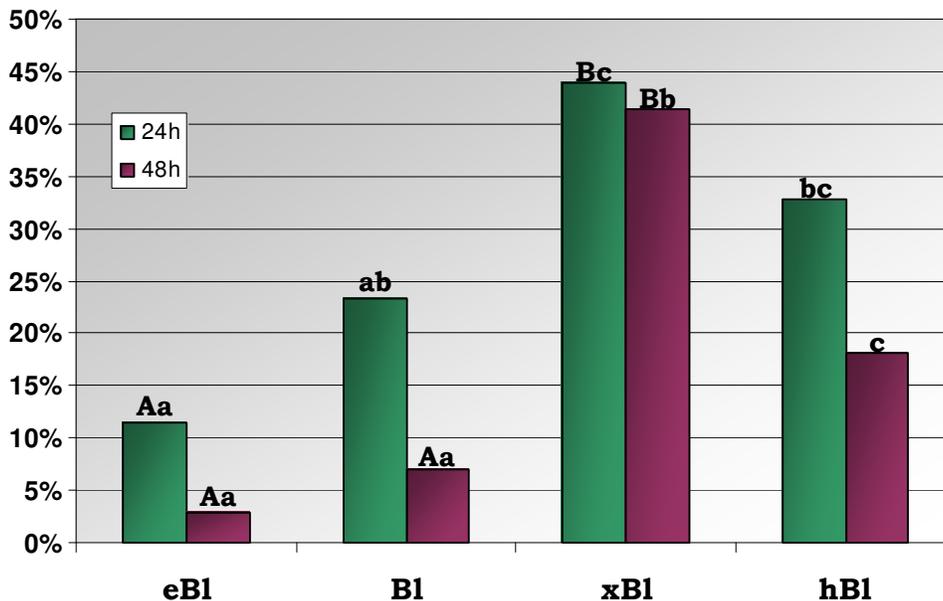
a,b,c valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.05  
 A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.01  
 \*B1 vs xB1 a 24h P=0.07

**Grafico 9.** Sopravvivenza embrionale di grado 1 e 2 dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 2.



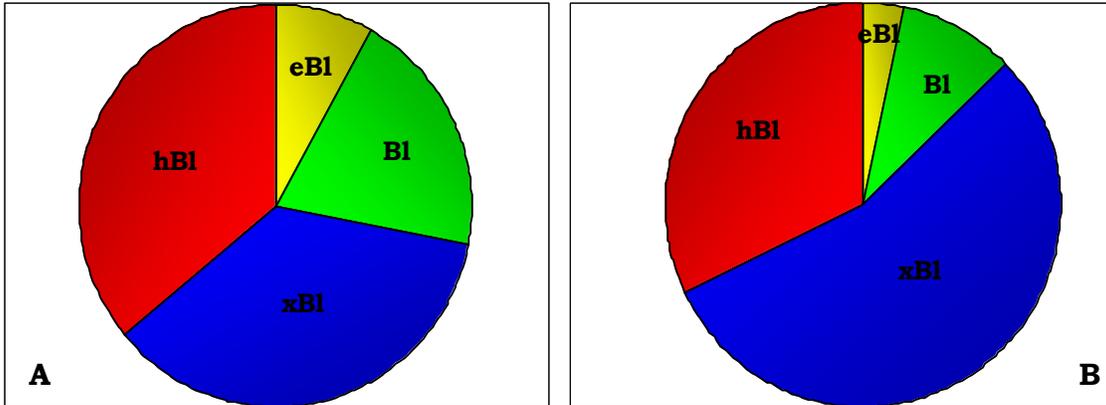
a,b,c valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.05  
 A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.01  
 \*eB1 vs hB1 a 24h P=0.068

**Grafico 10.** Sopravvivenza embrionale di grado 1 dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 2.

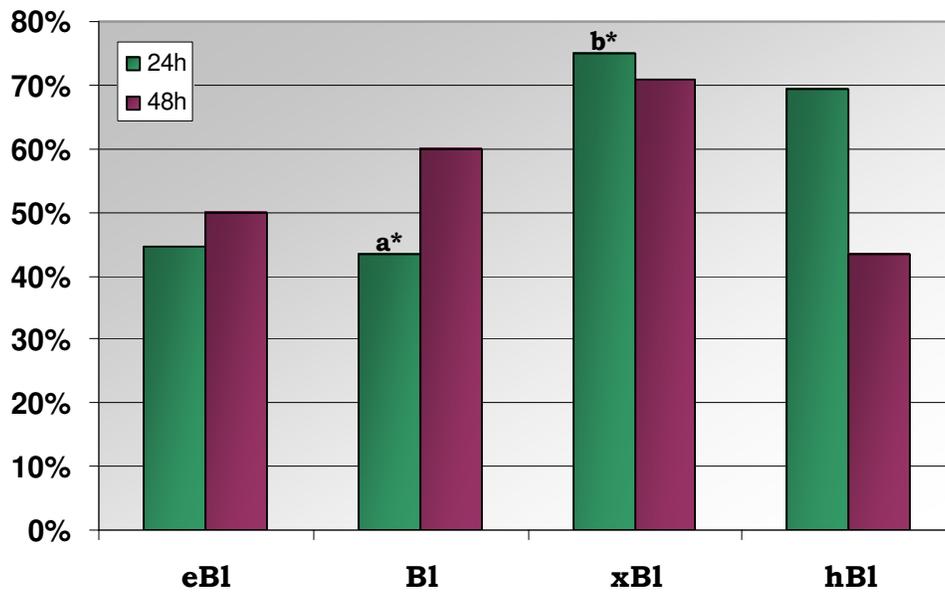


a,b,c valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.05  
 A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.01

**Grafico 11.** Distribuzione dei diversi stadi embrionali sul totale degli embrioni di grado 1 a 24h (A) e 48h (B) di coltura post-riscaldamento, Gruppo 2.



**Grafico 12.** Sopravvivenza embrionale di grado 1 rispetto agli embrioni trasferibili dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 2.



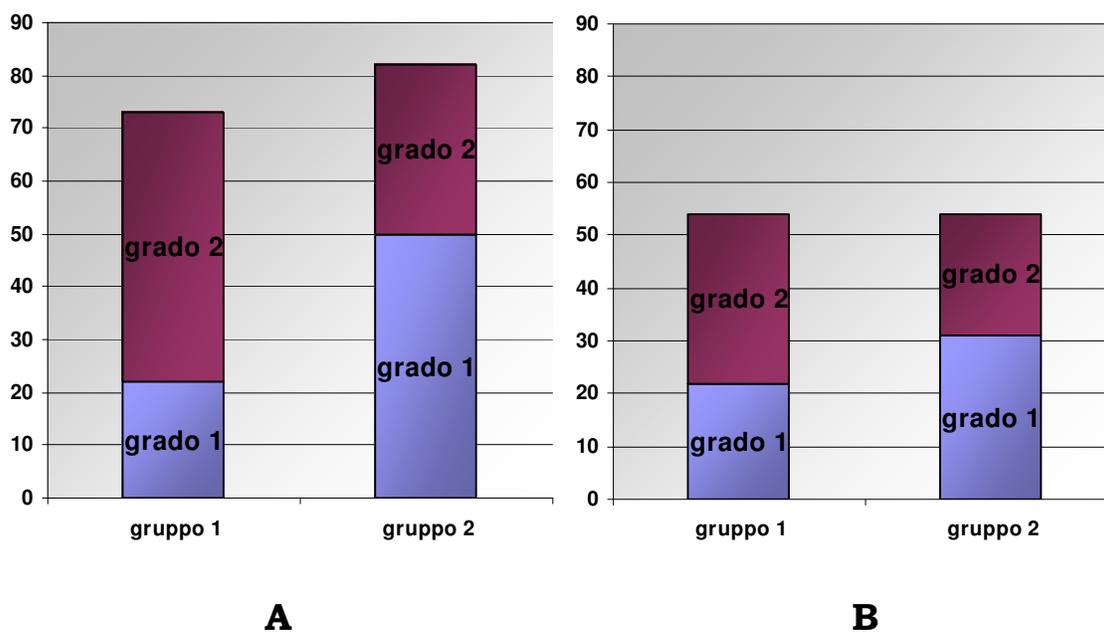
a\*,b\* valori contraddistinti da lettere diverse sono al limite della significatività, P=0.057.

**Tabella II.** Sopravvivenza degli embrioni di grado 1 sui totali trasferibili a 24 e 48h nei due gruppi.

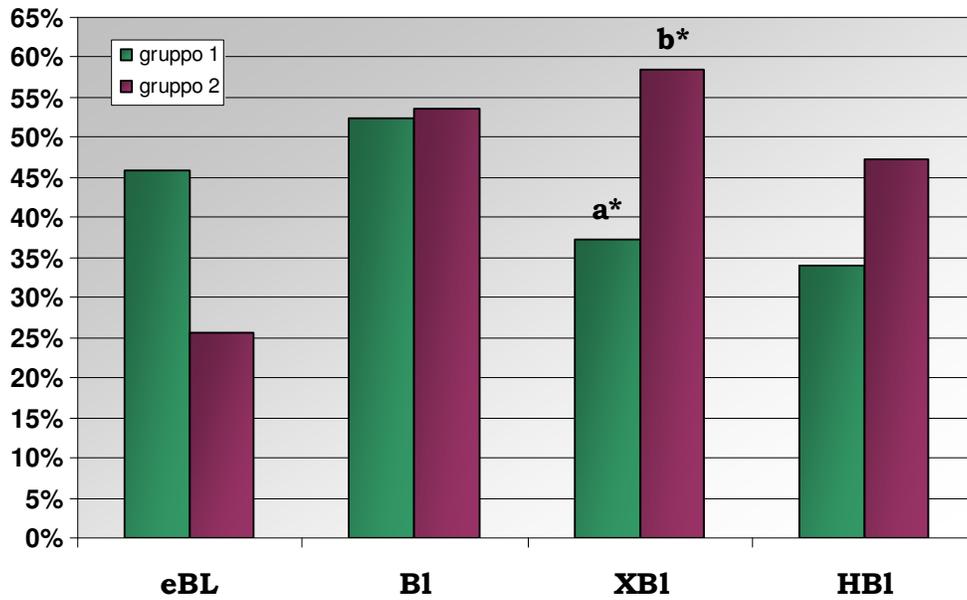
<b>Gruppo sperimentale</b>	<b>Vivi a 24h di grado 1 (%)</b>	<b>Vivi a 48h di grado 1 (%)</b>
<b>Gruppo 1</b>	22 (30) <sup>A</sup>	22 (41) <sup>a*</sup>
<b>Gruppo 2</b>	50 (61) <sup>B</sup>	31(57) <sup>b*</sup>

<sup>A, B</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno della stessa colonna; P<0.01  
<sup>a\*, b\*</sup> valori contraddistinti da lettere diverse hanno una P=0.08

**Grafico 13.** Numero di embrioni di grado 1 e 2 dopo 24 (A) e 48h (B) di coltura post-riscaldamento, Gruppo 2.

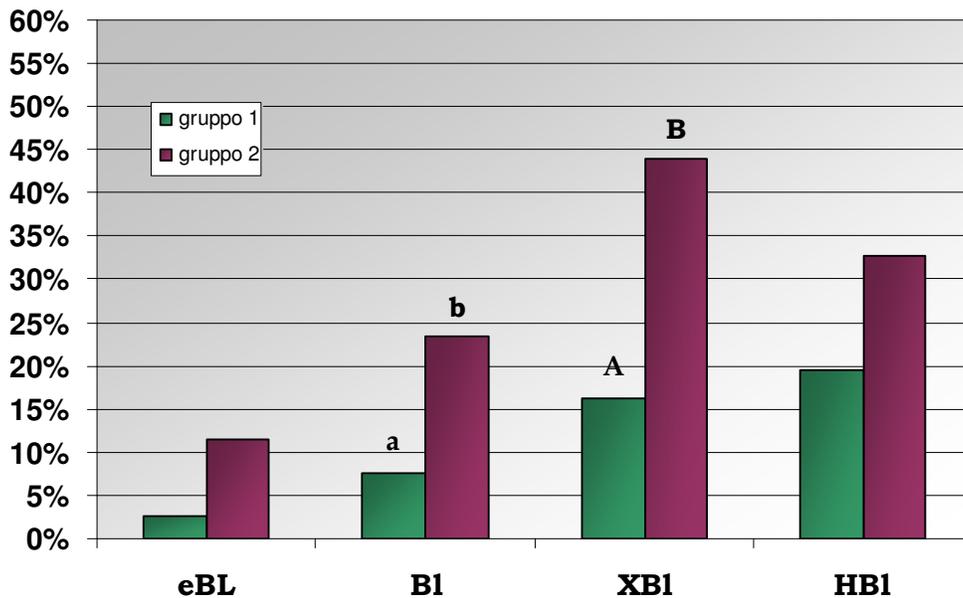


**Grafico 14.** Confronto delle percentuali di sopravvivenza embrionale di grado 1 e 2 dopo 24h di coltura post-riscaldamento nei gruppi 1 e 2.



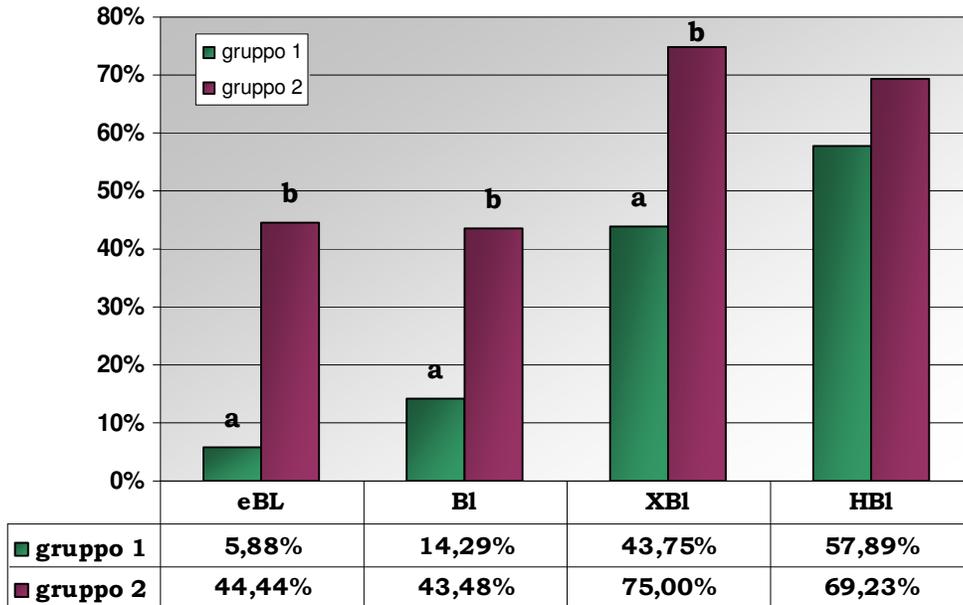
a\*,b\* valori contraddistinti da lettere diverse tendono alla significatività; P=0.05

**Grafico 15.** Confronto delle percentuali di sopravvivenza di embrioni di grado 1 sui vitrificati dopo 24h di coltura post-riscaldamento nei gruppi 1 e 2.



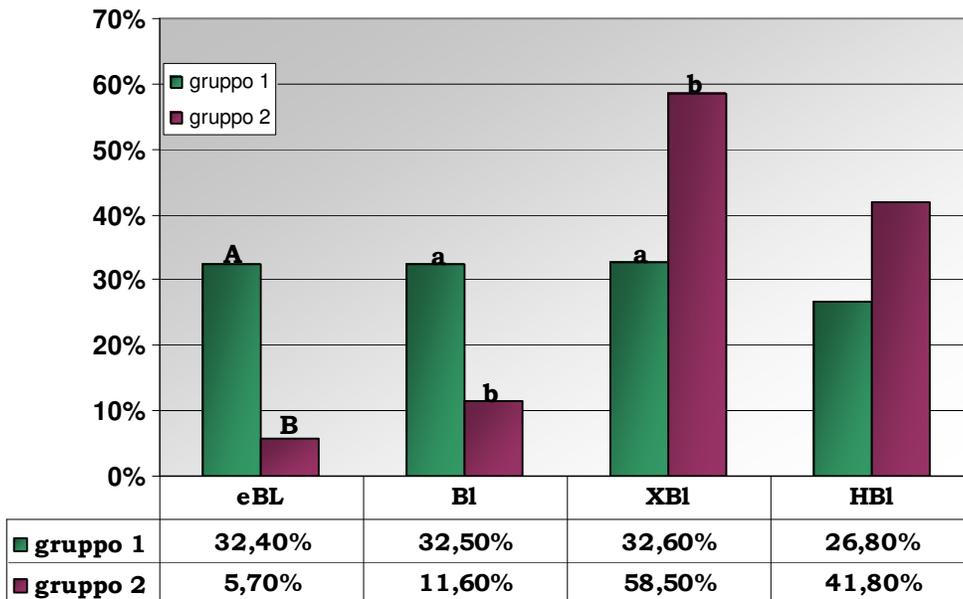
a,b valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno dello stesso stadio; P<0.05  
 A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno dello stesso stadio; P<0.01

**Grafico 16.** Confronto delle percentuali di sopravvivenza di embrioni di grado 1 sui trasferibili dopo 24h di coltura post-riscaldamento nei gruppi 1 e 2.



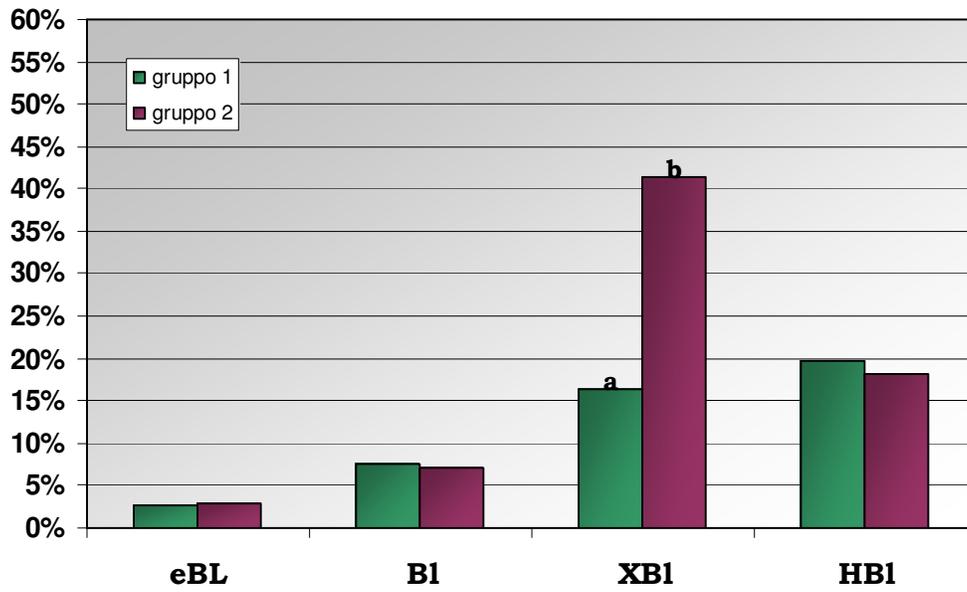
a,b valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno dello stesso stadio; P<0.05  
A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno dello stesso stadio; P<0.01

**Grafico 17.** Confronto delle percentuali di sopravvivenza di embrioni di grado 1 e 2 dopo 48h di coltura post-riscaldamento nei gruppi 1 e 2.



a,b valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno dello stesso stadio; P<0.05  
A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno dello stesso stadio; P<0.01

**Grafico 18.** Confronto delle percentuali di sopravvivenza di embrioni di grado 1 sui vitrificati dopo 48h di coltura post-riscaldamento nei gruppi 1 e 2.



<sup>a,b</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno dello stesso stadio; P<0.05

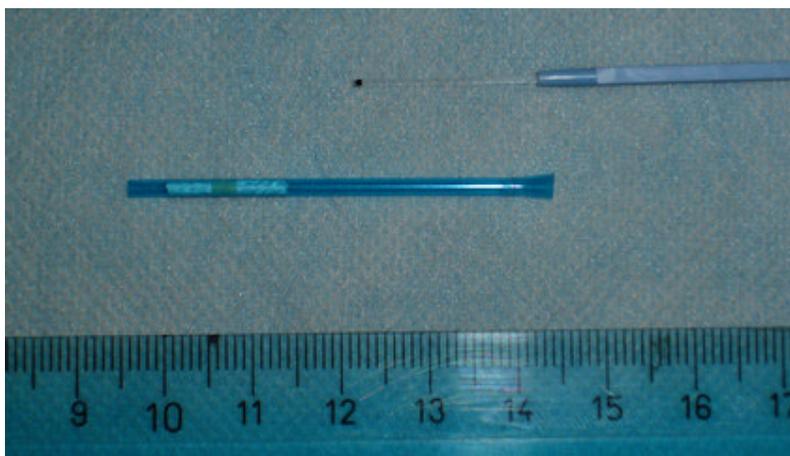
## ***ESPERIMENTO 3***

### **VITRIFICAZIONE DI EMBRIONI DI BUFALO E DI BOVINO MEDIANTE IL METODO CRYOTOP**

#### **Premessa e scopo del lavoro**

La metodica Cryotop (Kuwayama M. et al. 2005) è quella ideata più di recente utilizzando l'approccio dei volumi minimi di vitrificazione. Questo strumento è costituito da una sottile linguetta di polipropilene che misura 0.4 mm di diametro, 20 mm di lunghezza e 0.1 mm di spessore ed è collegata ad un manico di plastica provvisto di un cappuccio protettivo per la protezione del campione vitrificato durante lo stoccaggio in LN<sub>2</sub> (Kitazato Sully Co) (figura 7).

**Figura 7.** Cryotop (Kitazato Sully Co)



Sulla base delle nostre conoscenze, l'uso del Cryotop per vitrificare embrioni di bufalo e bovino è limitato ad un unico lavoro del 2005 (Laowtammathron C. et al., 2005), in cui sono stati vitrificati solo embrioni allo stadio di hBl, ottenuti dopo nuclear transfer (NT), e da cui è emerso che gli embrioni bufalini così ottenuti sono risultati più criotolleranti di quelli bovini. Visto che in questo ultimo lavoro la prova è stata limitata ad embrioni micromanipolati e ad un unico stadio di sviluppo embrionale, si è deciso di verificare se l'uso del Cryotop potesse migliorare la sopravvivenza in vitro non solo di embrioni IVP di bufalo, ma anche di bovino, e se lo stadio di sviluppo embrionale influenzasse, anche in questo caso, la criotolleranza. Così come per l'esperimento 2, abbiamo deciso di mantenere gli stessi protocolli di vitrificazione dei gruppi 1 e 2 e di variare unicamente lo strumento, sostituendo alla OPS dell'esperimento 2 il Cryotop, per dimostrare se un'ulteriore diminuzione del volume di vitrificazione, con un conseguente aumento della velocità di congelamento e, soprattutto di riscaldamento, potessero incrementare i risultati fino ad ora ottenuti nella crioconservazione di embrioni IVP di bufalo e bovino.

**Esperimento 3.1**  
**VITRIFICAZIONE DI EMBRIONI DI BUFALO MEDIANTE**  
**CRYOTOP**

**Materiali e Metodi**

Al giorno 7 di coltura embrioni morfologicamente intatti, a diversi stadi di sviluppo, sono stati selezionati e divisi in due gruppi sperimentali: gruppo 1, in cui è stato usato il protocollo di Vajta (Vajta et al., 1998) e gruppo 2, in cui è stato impiegato il protocollo di Neglia et al. del 2001. Il confronto tra i gruppi è stato ripetuto 14 volte.

**GRUPPO 1**

Per il gruppo 1 sono stati usati i media e il protocollo di vitrificazione/riscaldamento previamente utilizzati per il gruppo 1 dell'esperimento 2. Tutti i media di vitrificazione sono stati preparati a partire da una soluzione base di TCM-199 HEPES-tamponato supplementato con il 20 % di FCS (SB); i media sono stati riscaldati a circa 37°C per almeno 1h prima di essere utilizzati e tutta la procedura di vitrificazione è stata fatta usando un tavolino riscaldato a 37°C.

Embrioni di bufalo prodotti in vitro (N =77), a partire da ovaie da macello, sono stati valutati al giorno 7 di coltura e divisi per stadi di

sviluppo come negli esperimenti precedenti (TM =20; eBl =15; Bl =13; xBl =17; hBl =12).

### ***Fase di vitrificazione***

1. Dopo lavaggio in un terreno tamponato, per eliminare i residui di olio minerale derivanti dalle gocce di coltura, gli embrioni sono stati incubati singolarmente in gocce da 200  $\mu$ l di SB contenente 7.5 % di DMSO e 7.5 % di GE (SV1) per 3 minuti;
2. successivamente, gli embrioni sono stati trasferiti, mediante una pipetta a bocca, nel minor volume possibile, in gocce da 20  $\mu$ l di una soluzione 0.5 M di saccarosio in SB contenente 16.5 % di DMSO e 16.5 % di GE (SV2) per pochi secondi;
3. gli embrioni sono stati, così, presi mediante una pipetta a bocca nel minor volume possibile di SV2 (<0,1  $\mu$ l), messi sull'estremità di un cryotop, che entro 20 sec è stato immerso in LN<sub>2</sub>. Il volume di SV2 contenente l'embrione è stato stimato dalla lunghezza della colonna liquida all'interno della pipetta.

### ***Fase di riscaldamento***

1. Il cryotop è stato prelevato dall'LN<sub>2</sub> e la linguetta sottile su cui era stato precedentemente posto l'embrione è stata immediatamente

immersa in circa 1ml di una soluzione di TCM-199 HEPES-tamponato supplementato con il 20 % di FCS e 0.25 M di saccarosio per 1 minuto;

2. gli embrioni recuperati sono stati incubati poi per 5 minuti in una seconda soluzione di riscaldamento costituita da TCM-199 HEPES-tamponato supplementato con il 20% di FCS 0.15 M di saccarosio;
3. successivamente, gli embrioni sono stati lavati due volte nel medium SOF HEPES-tamponato, e trasferiti in gocce di 20  $\mu$ l di SOF tamponato con bicarbonato di sodio. Le piastrine con le gocce contenenti gli embrioni sono state poi messe in camere modulari a tenuta, nelle quali è stata insufflata una miscela gassosa con il 5 % di CO<sub>2</sub>, il 7 % di O<sub>2</sub> e l' 88 % di N<sub>2</sub>, alla temperatura di 38.5°C.

## **GRUPPO 2**

Per il gruppo 2 sono stati usati i media e il protocollo di vitrificazione/riscaldamento impiegato per il gruppo 2 dell'esperimento 2. Le soluzioni di vitrificazione sono state preparate usando una soluzione base (SB) di PBS a cui sono stati aggiunti 0.3 mM di sodio piruvato, 3.3 mM di glucosio e 20 % (v/v) di FCS.

Embrioni di bufalo prodotti in vitro (N =81), a partire da ovaie da macello, sono stati valutati al giorno 7 di coltura e divisi per stadi di sviluppo come negli esperimenti precedenti (TM =16; eBl =17; Bl =11; xBl =22; hBl =15).

### ***Fase di vitrificazione***

1. Dopo lavaggio in un terreno tamponato per eliminare i residui di olio minerale derivanti dalle gocce di coltura, gli embrioni sono stati incubati singolarmente in gocce da 200 µl di una soluzione contenente 1.4 M di G in SB (SV1) per 5 minuti;
2. a questo punto, gli embrioni sono stati trasferiti in gocce da 200 µl di una seconda soluzione (SV2) composta da 1.4 M di G e 3.6 M di GE in SB per altri 5 minuti;
3. successivamente, gli embrioni sono stati trasferiti, mediante una pipetta a bocca nel minor volume possibile, in gocce da 25 µl di una soluzione di 3.4 M di G e 4.6 M di GE in SB (SV3) per pochi secondi;

4. gli embrioni sono stati, così, presi mediante una pipetta a bocca, nel minor volume possibile di SV3 (<0.1µl) e messi sull'estremità di un Cryotop che, entro 20 secondi, è stato immerso in LN<sub>2</sub>.

### ***Fase di riscaldamento***

1. Il cryotop è stato prelevato dall' LN<sub>2</sub> e la linguetta sottile su cui era stato precedentemente posto l'embrione è stata immediatamente immersa in circa 1ml di una soluzione 0.5 M di saccarosio in SB per circa 15-20 secondi;

2. gli embrioni sono stati poi recuperati e incubati per 5 minuti in una seconda soluzione di riscaldamento allo 0.25 M di saccarosio in SB;

3. successivamente, gli embrioni sono stati lavati due volte in medium SOF Hepes-tamponato, e trasferiti in gocce di 20 µl di SOF tamponato con bicarbonato di sodio. Le piastrine con le gocce contenenti gli embrioni sono state poi messe in camere modulari a tenuta, nelle quali è stata insufflata una miscela gassosa con il 5 % di CO<sub>2</sub>, il 7 % di O<sub>2</sub> e l' 88 % di N<sub>2</sub>, alla temperatura di 38.5°C.

Per entrambi i gruppi, dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento è stata valutata la vitalità embrionale basandosi sulla

riespansione della blastocele e sulla ripresa di una normale morfologia embrionale.

### **Analisi Statistica**

Le sopravvivenze post-riscaldamento sono state analizzate mediante il test del chi-quadro e, quando il numero dei casi lo ha richiesto, è stato eseguito il test esatto di Fisher.

## **Risultati**

### **Gruppo 1**

Le percentuali di sopravvivenza degli embrioni trasferibili sul totale dei vitrificati, a 24h, hanno evidenziato una buona resistenza in tutti gli stadi tranne che in quello di TM. In particolare, come si può osservare dal grafico 19, lo stadio che ha mostrato la maggiore percentuale di sopravvivenza, rispetto a tutti gli altri, è quello di xBl, che è risultato, però, significativamente diverso solo dalle TM (71 vs 20 % rispettivamente;  $P < 0.01$ ); per quanto riguarda gli altri stadi è da sottolineare una tendenza alla significatività nel confronto tra TM e Bl (20 vs 54 % rispettivamente;  $P = 0.065$ ). A 48h, le xBl hanno continuato a essere lo stadio con la migliore sopravvivenza insieme alle Bl (41 e 38 %, rispettivamente), ed entrambe sono state differenti dai due stadi più precoci, mentre le hBl hanno mostrato una sopravvivenza intermedia, come si osserva dal grafico 19.

Esaminando solo i dati relativi agli embrioni di grado 1 sul totale degli embrioni vitrificati (grafico 20), è possibile osservare che, a 24h, in questo gruppo sperimentale gli embrioni di grado 1 ( $N = 22$ ) sono rappresentati per la maggior parte dalle xBl ( $N = 10$ ), come risulta dal pannello A; a 48h, si conferma questo andamento, in quanto su un totale di 11 embrioni di grado 1 sopravvissuti, 5 sono xBl (45,5 %) e i

restanti sono rappresentati dalle TM (N=1), dalle Bl (N=3) e dalle hBl (N=2), come si evince dal pannello B. Confrontando i vari stadi tra loro, è emerso che, a 24h, la percentuale di sopravvivenza delle xBl di grado 1 sugli embrioni vitrificati è significativamente maggiore rispetto a quella delle TM ( $P<0,01$ ) e delle eBl ( $P<0.05$ ), mentre a 48h, l'unica differenza evidenziabile è stata tra le xBl e le eBl ( $P<0.05$ ), come mostrato nel grafico 21.

## **Gruppo 2**

Per questo secondo gruppo sperimentale, le percentuali di sopravvivenza degli embrioni trasferibili sul totale dei vitrificati, a 24h, sono risultate maggiori per gli stadi di xBl e di hBl rispetto a quello di TM ( $P<0.05$ ), mentre a 48h, la percentuale delle hBl è stata maggiore rispetto alle TM ( $P<0.05$ ), come illustrato nel grafico 22.

La percentuale di sopravvivenza degli embrioni di grado 1 sul totale dei trasferibili, a 24h, è risultata maggiore per lo stadio di xBl rispetto a quelli di TM ( $P<0.05$ ), di eBl ( $P=0.052$ ) e di Bl ( $P<0.05$ ), ma non è stata differente da quella delle hBl. A 48h, invece, non è emersa alcuna differenza (grafico 23).

### ***Confronto tra il Gruppo 1 ed il Gruppo 2***

Non sono emerse differenze significative nelle percentuali di sopravvivenza in toto (grado 1, 2 e 3) sia a 24h (57 vs 56 % rispettivamente per il gruppo 1 e 2), sia a 48h (31 vs 21 % rispettivamente gruppo 1 e 2). Vale la pena sottolineare che eliminando le TM, che hanno presentato la minore efficienza, queste percentuali salgono a 68 e 58 % rispettivamente nel gruppo 1 e 2 a 24h e a 39 e 26 % a 48h.

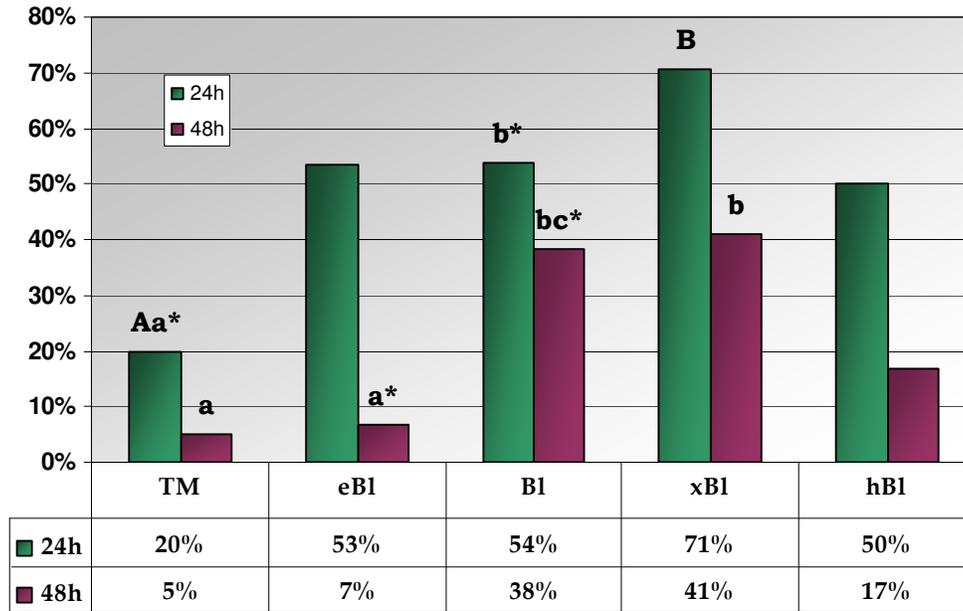
Il confronto tra i due gruppi non ha evidenziato nessuna differenza nelle percentuali di sopravvivenza degli embrioni trasferibili sul totale dei vitrificati sia a 24h (48 e 37 % rispettivamente nei gruppi 1 e 2) che a 48h (21 e 15 % rispettivamente per i gruppi 1 e 2). È, invece emersa, solo a 24h, una tendenza alla significatività quando si sono confrontate le percentuali di sopravvivenza degli embrioni di grado 1 sul totale dei vitrificati, a favore del gruppo 1 (29 vs 16 % rispettivamente per il gruppo 1 e 2;  $P=0.058$ ).

Visto, però, che in entrambi i gruppi sperimentali è stato evidente un andamento simile dei diversi stadi, e che confrontando gli stessi stadi tra i due gruppi non sono emerse differenze (dati riportati precedentemente nel gruppo 1 e 2), abbiamo ritenuto opportuno non tenere conto del protocollo, per meglio indagare, aumentando il numero dei casi, l'effetto dello stadio di sviluppo sull'efficienza di

vitrificazione con questo strumento. In effetti, ciò ci ha consentito di confermare quello che ci era apparso già evidente ad una prima analisi: lo stadio di TM e, tendenzialmente quello di eBl, sono quelli più sensibili alla vitrificazione, rispetto agli altri stadi. Ciò è stato confermato osservando le percentuali di sopravvivenza degli embrioni trasferibili; come si nota dal grafico 24 lo stadio di TM ha presentato la percentuale più bassa ( $P < 0.05$ ) rispetto a tutti gli altri stadi a 24h; anche a 48h, lo stadio di TM ha dato il peggiore ( $P < 0.05$ ) risultato rispetto a tutti gli stadi tranne che rispetto alle eBl.

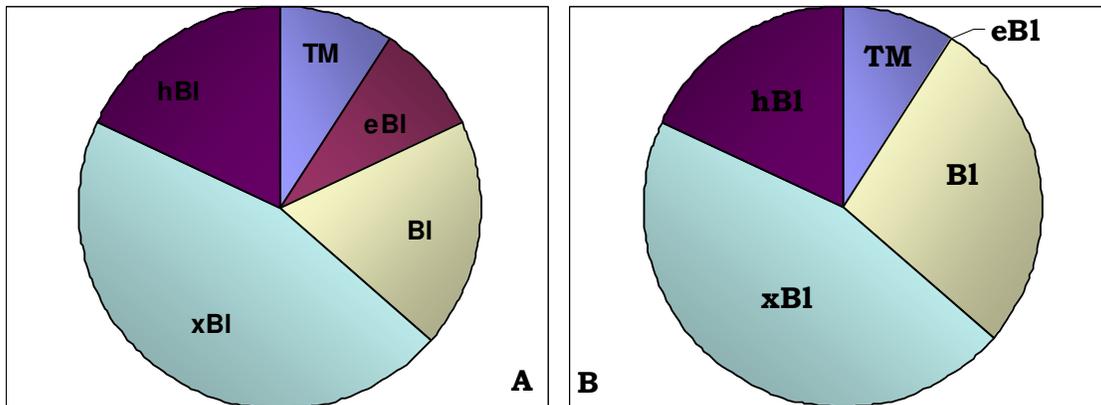
Considerando le percentuali di sopravvivenza degli embrioni di grado 1 sul totale dei vitrificati è risultato evidente che gli stadi di xBl e di hBl sono i più criotolleranti e, in particolare, che a 24h le xBl sono diverse dalle TM, dalle eBl e dalle Bl (46 vs 6, 3 e 17 %, rispettivamente;  $P < 0.05$ ), mentre a 48h sono diverse solo da TM e eBl (21 vs 3 e 3 %, rispettivamente;  $P < 0.05$ ), come osservato nel grafico 25.

**Grafico 19.** Sopravvivenza degli embrioni di grado 1 e 2 dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 1

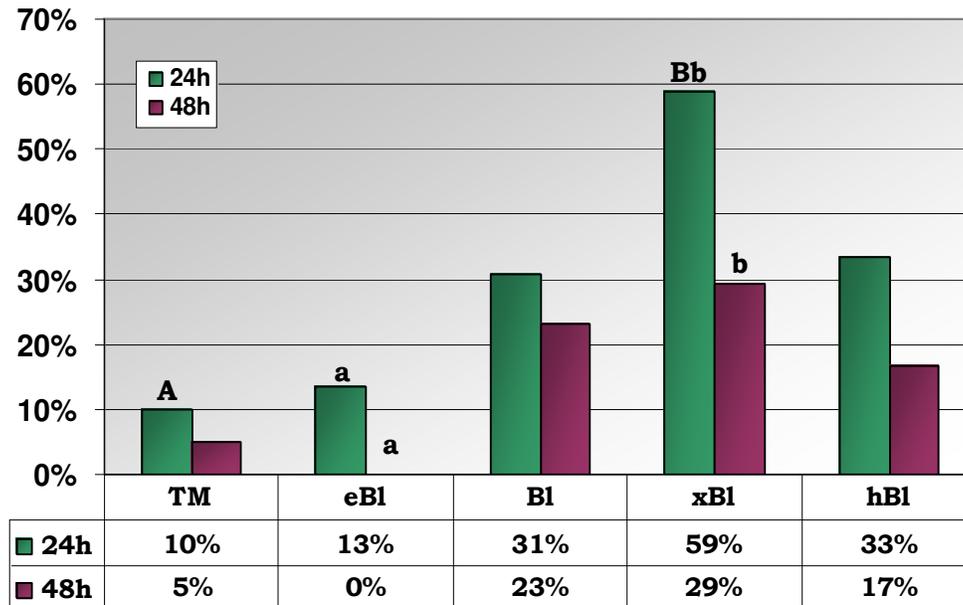


A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0,01  
 a,b,c valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0,05  
 \*TM vs B1 P=0,065 a 24h  
 \*eB1 vs B1 P=0,07 a 48h

**Grafico 20.** Distribuzione dei diversi stadi embrionali di grado 1 sui trasferibili a 24h (A) e 48h (B) di coltura post-riscaldamento gruppo 1.

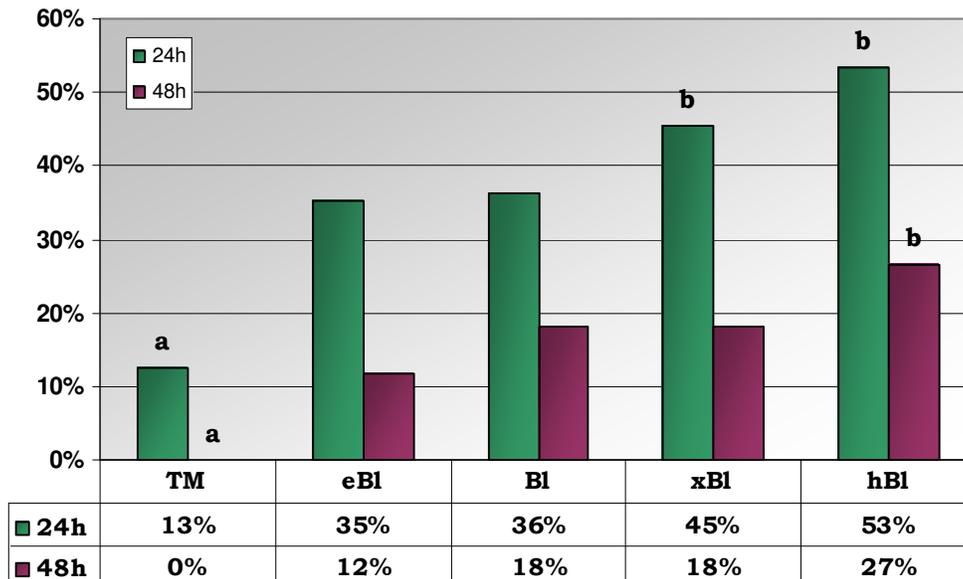


**Grafico 21.** Sopravvivenza degli embrioni di grado 1 sui vitrificati dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 1



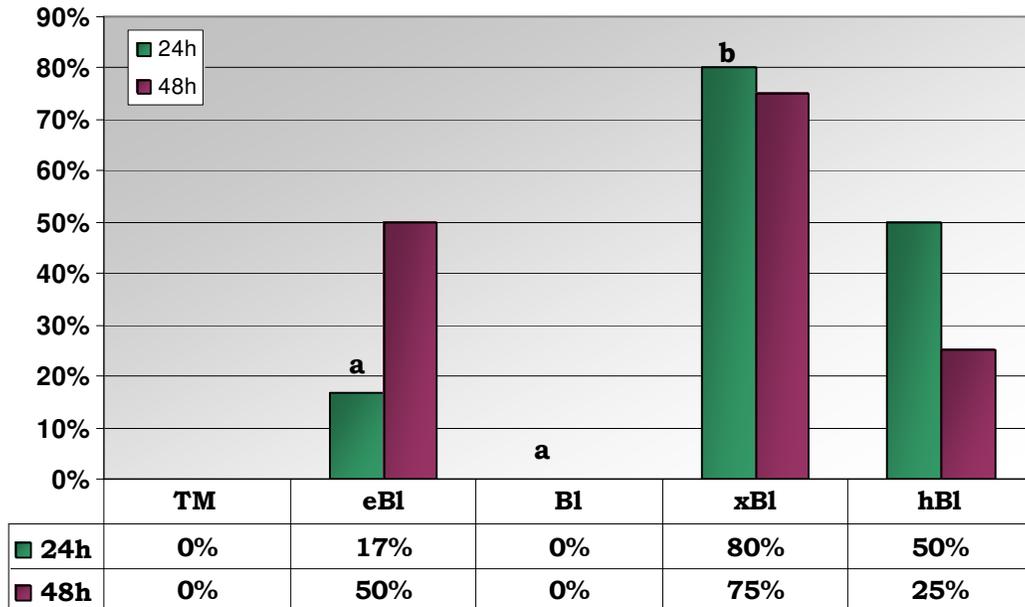
<sup>A,B</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0,01  
<sup>a,b</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0,05

**Grafico 22.** Sopravvivenza degli embrioni di grado 1 e 2 dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 2



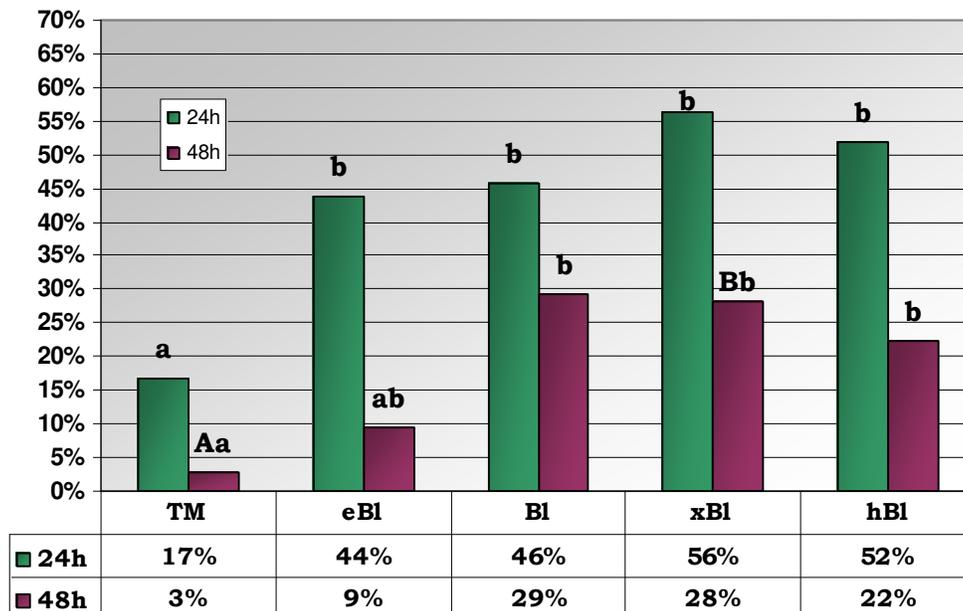
<sup>a,b</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0,05

**Grafico 23.** Sopravvivenza degli embrioni di grado 1 sui trasferibili dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 2



a,b valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.05

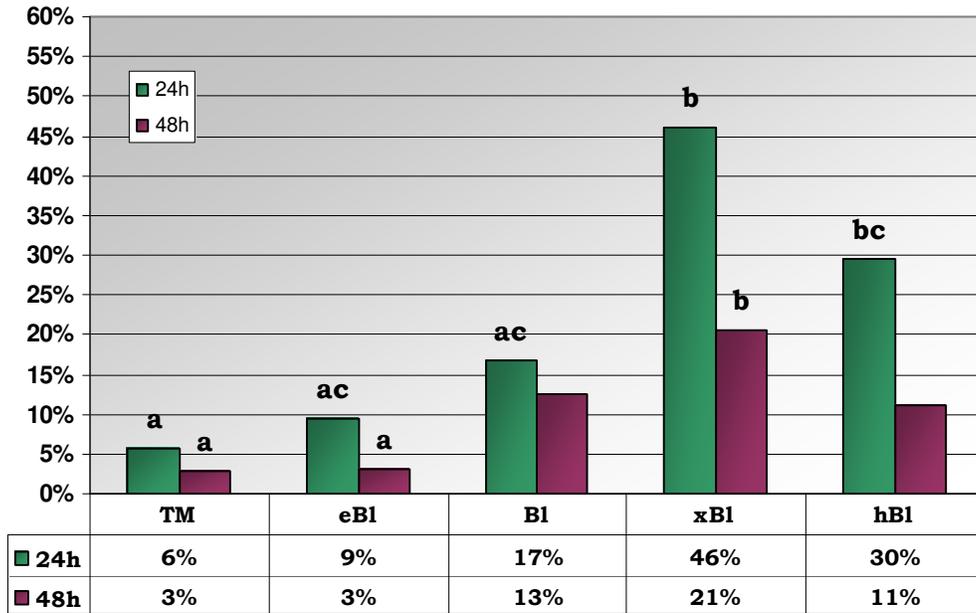
**Grafico 24.** Sopravvivenza degli embrioni di grado 1 e 2 dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento sommando gli embrioni del gruppo 1 e 2



A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0,01

a,b valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.05

**Grafico 25.** Sopravvivenza degli embrioni di grado 1 sui vitrificati dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento sommando gli embrioni dei gruppi 1 e 2.



<sup>a,b,c</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.05

## **Esperimento 3.2**

# **VITRIFICAZIONE DI EMBRIONI DI BOVINO MEDIANTE CRYOTOP**

## **Materiali e Metodi**

Al giorno 7 di coltura embrioni di bovino morfologicamente intatti, a diversi stadi di sviluppo, sono stati selezionati e divisi in due gruppi sperimentali: gruppo 1, in cui è stato usato il protocollo di Vajta (Vajta et al., 1998) e gruppo 2, in cui è stato impiegato il protocollo di Neglia et al. del 2001. Il confronto tra i gruppi è stato ripetuto 5 volte.

### **GRUPPO 1**

Per il gruppo 1 sono stati usati i media e il protocollo di vitrificazione/riscaldamento previamente utilizzati per il gruppo 1 dell'esperimento 2. Tutti i media di vitrificazione sono stati preparati a partire da una soluzione base di TCM-199 Hapes-tamponato supplementato con il 20 % di FCS (SB); i media sono stati riscaldati a circa 37°C per almeno 1h prima di essere utilizzati e tutta la procedura di vitrificazione è stata fatta usando un tavolino riscaldato a 37°C.

Embrioni di bovino prodotti in vitro (N =179), a partire da ovaie da macello, sono stati valutati al giorno 7 di coltura e divisi per stadi di

sviluppo come negli esperimenti precedenti (TM =15; eBl =33; Bl =47; xBl =80; hBl =7).

### ***Fase di vitrificazione e riscaldamento***

Gli embrioni sono stati vitrificati e riscaldati singolarmente come precedentemente descritto per il gruppo 1 dell'esperimento 3.1.

## **GRUPPO 2**

Per il gruppo 2 sono stati usati i media e il protocollo di vitrificazione/riscaldamento impiegati per il gruppo 2 dell'esperimento 2. Le soluzioni di vitrificazione sono state preparate usando una soluzione base (SB) di PBS a cui sono stati aggiunti 0.3mM di sodio piruvato, 3.3mM di glucosio e 20 %(v/v) di FCS.

Embrioni di bovino prodotti in vitro (N =182), a partire da ovaie da macello, sono stati valutati al giorno 7 di coltura e divisi per stadi di sviluppo come negli esperimenti precedenti (TM =13; eBl =34; Bl =49; xBl =77; hBl =6).

### ***Fase di vitrificazione e riscaldamento***

Gli embrioni sono stati vitrificati e riscaldati singolarmente come precedentemente descritto per il gruppo 2 dell'esperimento 3.1.

## **Analisi Statistica**

Le sopravvivenze post-riscaldamento sono state analizzate mediante il test del chi-quadro e, quando il numero dei casi lo ha richiesto, è stato eseguito il test esatto di Fisher.

## **Risultati**

### ***Gruppo 1***

Come si evince dal grafico 26, la percentuale di sopravvivenza degli embrioni trasferibili sul totale dei vitrificati, a 24h, è risultata più elevata nel caso delle xBl rispetto alle TM ( $P<0.01$ ), alle eBl ( $P<0.01$ ) ed alle Bl ( $P<0.05$ ), ma sovrapponibile a quella riportata per le hBl, mentre a 48h non è emersa nessuna differenza tra gli stadi.

L'analisi delle percentuali degli embrioni di grado 1 sul totale dei vitrificati, ha evidenziato una migliore efficienza delle xBl rispetto alle TM ( $P=0.06$ ) e alle eBl ( $P<0.01$ ) a 24h, mentre nessuna differenza è stata osservata a 48h, come illustrato dal grafico 27.

### ***Gruppo 2***

Come si può osservare dal grafico 28, la percentuale di sopravvivenza degli embrioni trasferibili sul totale dei vitrificati, analogamente al gruppo 1, è risultata maggiore per le xBl rispetto alle TM ( $P<0.01$ ), alle eBl ( $P<0.01$ ) ed alle Bl ( $P<0.05$ ) a 24h, ma solo rispetto alle Bl ( $P<0.05$ ) a 48h.

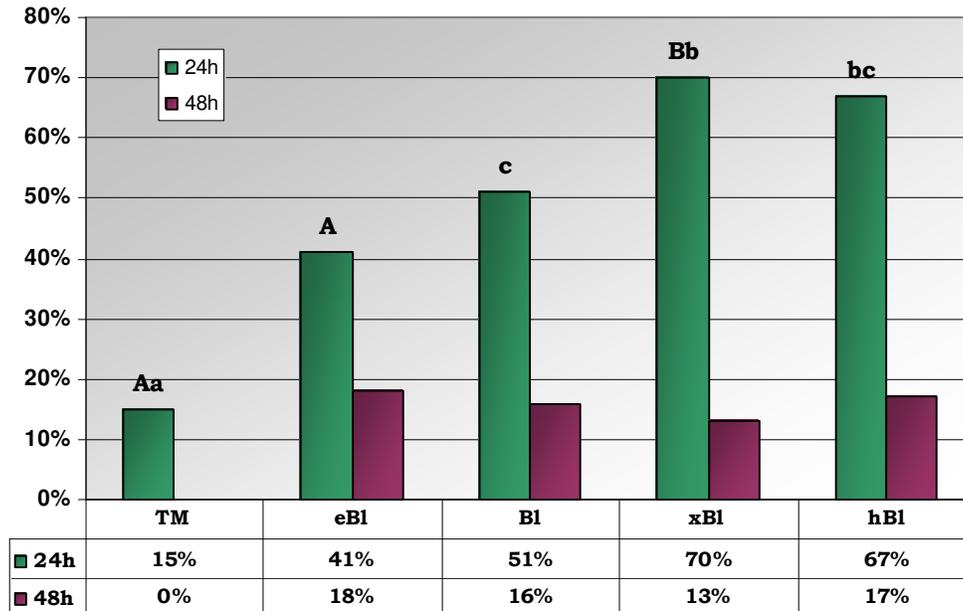
Quando sono stati considerati solo gli embrioni di grado 1 sul totale dei vitrificati, a 24h le maggiori percentuali di sopravvivenza sono state riscontrate nelle xBl rispetto alle TM ( $P<0.05$ ), alle eBl

( $P < 0.01$ ) e alle Bl ( $P < 0.05$ ) e anche le hBl hanno dato percentuali di sopravvivenza più alte rispetto alle TM ( $P < 0.05$ ), alle eBl ( $P = 0.055$ ) e alle Bl ( $P < 0.05$ ); nessuna differenza, invece, è stata osservata a 48h (grafico 29).

### ***Confronto tra i due gruppi***

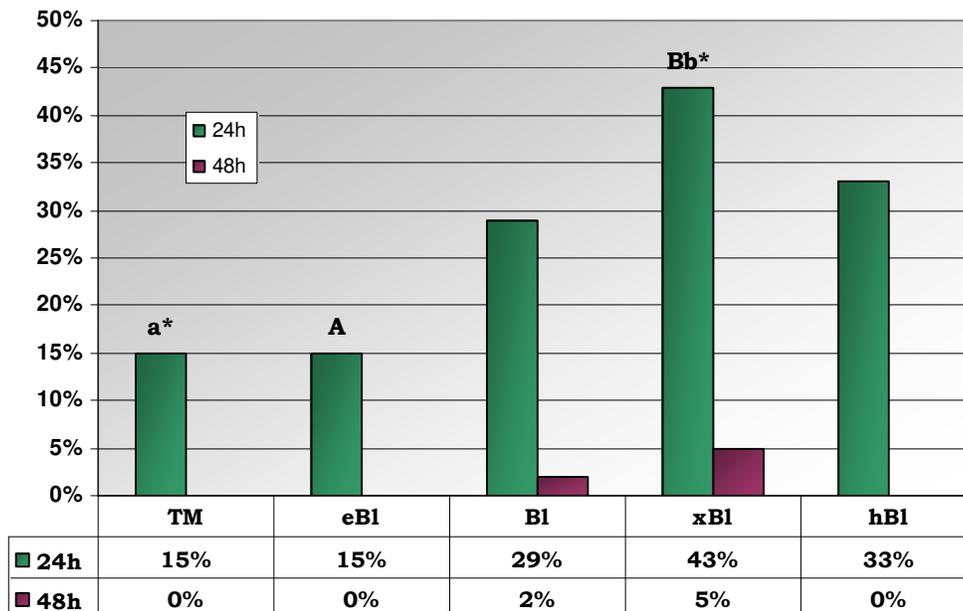
Confrontando i due gruppi è stata osservata una migliore efficienza del gruppo 1 rispetto al gruppo 2 limitatamente alle percentuali di sopravvivenza degli embrioni trasferibili sul totale dei vitrificati a 24h (55 vs 43 % rispettivamente;  $P < 0.05$ ). Non è stata osservata, invece, alcuna differenza tra i gruppi nelle percentuali di sopravvivenza degli embrioni di grado 1 sul totale dei vitrificati, sia a 24 che a 48h. Inoltre, confrontando gli embrioni dello stesso stadio tra i due gruppi, non è emersa nessuna differenza, nei parametri prima esaminati, né a 24 né a 48h.

**Grafico 26.** Sopravvivenze degli embrioni di grado 1 e 2 dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 1.



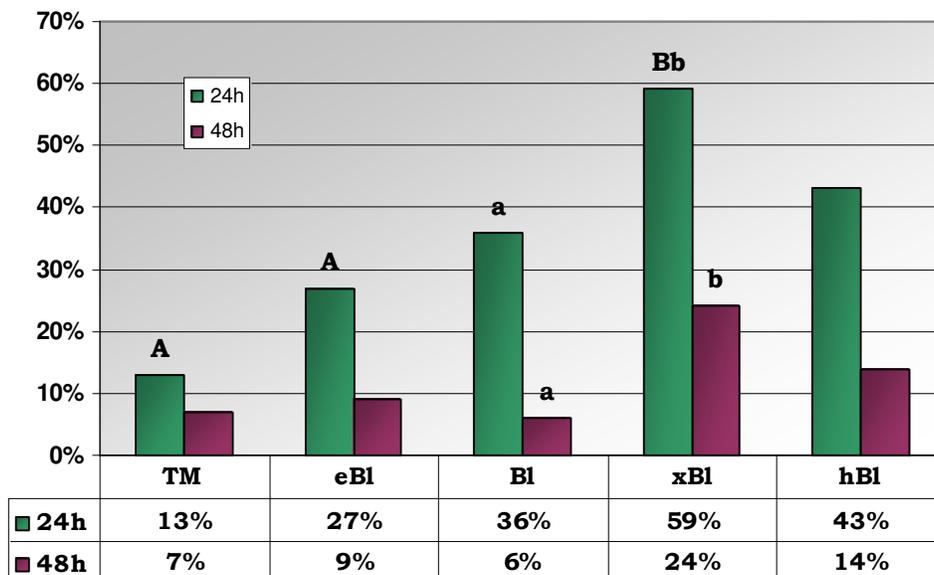
<sup>A,B</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.01  
<sup>a,b,c</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.05

**Grafico 27.** Sopravvivenze degli embrioni di grado 1 sui vitrificati dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 1.



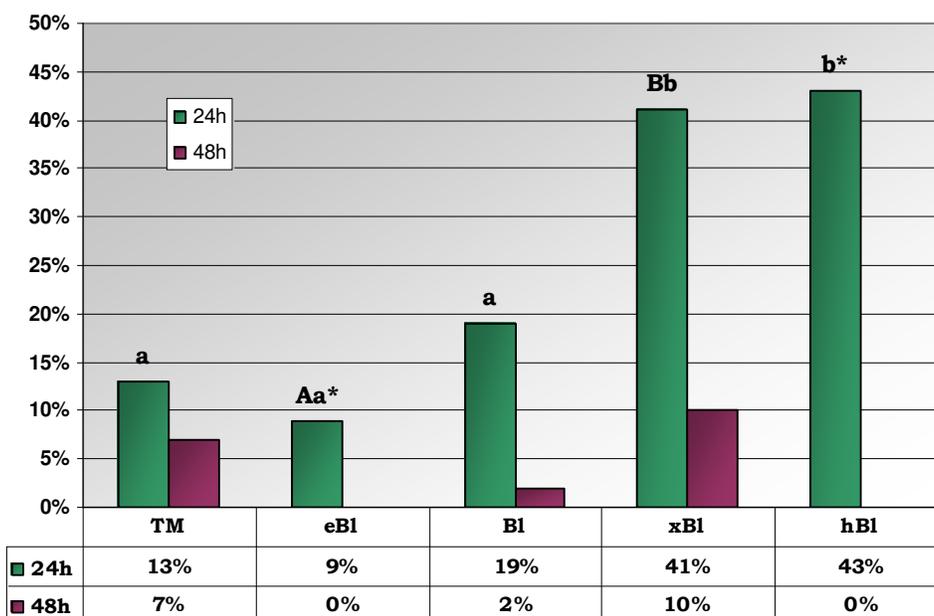
<sup>A,B</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.01  
<sup>\*</sup>xBIvsTM P=0.06 a 24h

**Grafico 28.** Sopravvivenze di embrioni di grado 1 e 2 dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 2.



A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.01  
a,b, valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.05

**Grafico 29.** Sopravvivenze di embrioni di grado 1 sui vitrificati dopo 24 e 48h di coltura post-riscaldamento, Gruppo 2.



A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.01  
a,b, valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti all'interno degli stessi tempi; P<0.05  
\*hBlvseBl P=0.055 a 24h

## **CAPITOLO 4**

### **DISCUSSIONE**

La crioconservazione embrionale rappresenta una delle tecnologie fondamentali per la diffusione in campo delle biotecnologie applicate alla riproduzione degli animali di interesse zootecnico, che sono oggi lo strumento più valido per accelerare il miglioramento genetico, da cui dipende la competitività di intere filiere produttive. In questo scenario, la crioconservazione assume un ruolo sostanziale in quanto consente, grazie alla possibilità di conservare gli embrioni per periodi illimitati di tempo, di programmare i trasferimenti embrionali così da semplificare gli interventi stessi, ridurre i costi ed ottimizzare le performance aziendali. Inoltre, la crioconservazione assume maggiore importanza nelle specie stagionali, come appunto la bufala, in cui il successo dell'ET è fortemente influenzato dalla stagionalità dell'attività riproduttiva.

L'applicazione delle moderne biotecnologie a questa specie è ostacolata in parte da alcune caratteristiche fisiologiche intrinseche della specie, che impediscono di raggiungere gli stessi traguardi ottenibili, in termini di rese embrionali, invece, nella specie bovina. Tra queste, sono sicuramente da menzionare l'esigua popolazione di

follicoli primordiali presenti nell'ovaio alla nascita, 20.000 nella bufala rispetto ai 100.000 nella bovina, e la qualità più scadente degli oociti recuperabili con le tecniche oggi disponibili (Boni et al., 1996); questi fattori sono responsabili della bassa risposta ai trattamenti di superovulazione che si riscontra in questa specie e, quindi, della bassa produzione embrionale nei programmi MOET (da 7 a 10 embrioni per la specie bovina rispetto a 1.7 per quella bufalina). Le suddette caratteristiche sono anche la causa del basso recupero di oociti da ovaie da macello (2.4 oociti/ovaio per la bufala rispetto ai 10 oociti/ovaio nella bovina; Gasparrini et al. 2000), problema accentuato dal fatto che la bufala viene di solito macellata alla fine della sua carriera produttiva, quando la fertilità è notevolmente ridotta e il numero di follicoli è drasticamente calato, al contrario di quanto accade nella bovina. La ragione della minore efficienza della IVEP nel bufalo è, probabilmente, dovuta al fatto che spesso, in questa specie, vengono usati gli stessi protocolli impiegati nella bovina senza tenere conto delle profonde differenze fisiologiche esistenti tra queste due specie. Tutto ciò si riflette, ovviamente, sull'efficienza dei sistemi di produzione embrionale in vitro, in cui il basso cleavage (65 % nella bufala e 84 % nella bovina) e, di conseguenza, la bassa percentuale di embrioni prodotti (30 % nella bufala, e 50 % nella bovina) influiscono fortemente sulla disponibilità di materiale sperimentale, già scarso per

tutti i motivi menzionati. In altri termini, la scarsa disponibilità di materiale sperimentale, dovuta sia al numero limitato di capi allevati, almeno nel nostro Paese (275.000 bufali rispetto ai 7000000 di bovini), sia al basso numero di oociti recuperabili per ovaia, rappresenta un fattore fortemente limitante il progresso scientifico. Inoltre, se nel settore di ricerca della produzione embrionale in vitro questo elemento comporta un'obiettiva difficoltà nella pianificazione sperimentale, tale limite diviene ancora maggiore nel momento in cui si studiano gli aspetti della crioconservazione embrionale; infatti se il numero di oociti è già scarso di partenza, il numero degli embrioni è decisamente inferiore perché, in un sistema IVEP efficiente, solo il 30 % degli oociti posti in maturazione raggiungerà lo stadio di TM/Bl.

Un altro fattore limitante in questa specie è rappresentato dalla scarsa congelabilità degli embrioni IVP, problematica che, allo stato attuale, può essere risolta solo ricorrendo all'utilizzo di un ospite intermedio in cui effettuare la coltura degli zigoti. L'approfondimento delle conoscenze specie-specifiche, ottenuto nell'arco di anni di sperimentazione, ha già portato ad un sensibile miglioramento dell'efficienza IVEP ed ha, ad esempio, evidenziato che gli embrioni bufalini sono più "vicini" a quelli ovini che a quelli bovini. Una delle conferme di questa ipotesi si è ottenuta proprio nel campo della crioconservazione. Infatti, nel 1998 Galli e collaboratori hanno

riportato per la prima volta la nascita di tre vitelli bufalini dopo il trasferimento di nove embrioni, ottenuti da oociti fecondati in vitro, trasferiti in ovidutto di pecora per la coltura in vivo fino allo stadio di blastocisti e congelati con l'uso della metodica tradizionale di congelamento lento (Galli et al., 1998), dimostrando che la coltura in vivo aumenta la congelabilità degli embrioni di bufalo prodotti in vitro. Questo approccio, ovvero la coltura nelle tube legate dell'ospite, che incrementa notevolmente la resistenza al congelamento, è però, da un punto di vista economico ed etico improponibile quando si vuole produrre embrioni su larga scala.

Diversi studi hanno dimostrato che gli embrioni in vitro sono molto sensibili alle basse temperature, anche perché più ricchi in lipidi della controparte in vivo, e ciò sembra, almeno parzialmente, imputabile alle stesse condizioni di coltura. Infatti, molti autori hanno dimostrato che modificando queste ultime, ad esempio sostituendo al siero l'albumina, si migliora la qualità degli embrioni e ciò è strettamente connesso al minore contenuto lipidico (Rizos D. et al. 2002 e 2003). Il differente contenuto lipidico degli embrioni sembra essere alla base delle differenze riscontrate nella resistenza alla crioconservazione di embrioni di specie diverse. E' noto che, ad esempio, gli embrioni di maiale, ricchi in lipidi, sono particolarmente sensibili alle basse temperature. E' stato anche dimostrato che gli

embrioni di bufalo sono particolarmente ricchi in granuli lipidici (Boni et al., 1992), la qual cosa è anche facilmente evidenziabile dall'aspetto scuro che li contraddistingue all'osservazione microscopica e, pertanto, risultano difficilmente congelabili.

Scarsi sono i dati presenti in letteratura riguardanti la crioconservazione di embrioni di bufalo prodotti in vitro. Nel 2001, Neglia e colleghi hanno riportato con successo la vitrificazione di embrioni bufalini interamente prodotti in vitro impiegando una metodica previamente utilizzata nella specie ovina (Naitana S. et al., 1996). In questo esperimento la percentuale di sopravvivenza di embrioni bufalini, dopo 24h di coltura post-riscaldamento, valutata in base al ripristino di una normale morfologia e alla riespansione della blastocela, è risultata del 65 %, e non è stata riscontrata nessuna differenza tra i vari stadi di sviluppo considerati, mentre è stato dimostrato che embrioni precoci nello sviluppo resistono meglio alla vitrificazione rispetto a quelli più tardivi. Infatti, la sopravvivenza dopo 48h di coltura è risultata maggiore per gli embrioni vitrificati al giorno 6 e 7 di coltura (66.6 % e 53.7 %, rispettivamente) rispetto a quelli vitrificati al giorno 8 (30.4 %). Ciò non è sorprendente perché è noto che la qualità embrionale rappresenta il fattore che principalmente influenza l'efficienza della crioconservazione ed è altresì noto che la precocità di sviluppo è un indicatore affidabile della vitalità embrionale;

gli embrioni che raggiungono lo stadio di blastocisti al giorno 6 mostrano uno sviluppo anticipato, che corrisponde, quindi, ad una migliore vitalità.

Visti i pochi dati pubblicati sulla crioconservazione di embrioni bufalini IVP, e l'importanza di questa specie, lo scopo del presente studio è stato quello di verificare la possibilità di crioconservare embrioni di bufalo interamente prodotti in vitro mediante diverse tecniche di vitrificazione. In particolare sono stati messi a confronto tre strumenti di vitrificazione, la tradizionale paillette da inseminazione, la OPS ed il Cryotop, che differiscono principalmente per i volumi di soluzione vitrificante utilizzati (25  $\mu$ l, 1.5  $\mu$ l e <0.1  $\mu$ l, rispettivamente con il metodo delle paillette, delle OPS e del cryotop) e, quindi, per le velocità di raffreddamento (4460°C/min, 16340°C/min e 22800°C/min rispettivamente) e di riscaldamento (1300°C/min, 13900°C/min e 42100°C rispettivamente) raggiungibili.

Nell'esperimento 1.1 abbiamo valutato l'efficienza della vitrificazione, in termini di percentuali di sopravvivenza in vitro dopo riscaldamento, di embrioni di bufalo IVP utilizzando la metodica precedentemente impiegata da Neglia e collaboratori nel 2001. Infatti, dati i notevoli progressi ottenuti negli ultimi anni nel campo della produzione embrionale in vitro (Gasparrini B. et al., 2003) e,

considerato che la qualità embrionale è fondamentale ai fini del successo della crioconservazione, si è ritenuto importante verificare se il miglioramento della qualità embrionale ottenuto nel sistema IVEP ottimizzato fosse associato ad una maggiore tolleranza degli embrioni alla vitrificazione. Rispetto al lavoro di Neglia et al, nel nostro studio abbiamo analizzato più specificamente le percentuali di sopravvivenza osservate. Infatti, oltre alla percentuale di sopravvivenza del totale degli embrioni vitrificati, senza tenere conto dello stadio e del grado di sopravvivenza, abbiamo analizzato nel dettaglio la sopravvivenza degli embrioni considerati trasferibili, secondo caratteristiche universalmente accettate, in quanto, ai fini del trasferimento in animali riceventi, possono essere considerati solo quegli embrioni che non solo sopravvivono, ma che mostrano anche una buona qualità (embrioni di grado 1 e 2).

Dai nostri risultati è emersa una percentuale di sopravvivenza degli embrioni totali vitrificati sia a 24 che a 48h di coltura post-riscaldamento, sovrapponibile a quella precedentemente ottenuta da Neglia et al. Invece, contrariamente a quanto riportato nel succitato studio in cui non era stato osservato alcun effetto dello stadio di sviluppo, probabilmente a causa della numerosità dei casi, nella nostra esperienza risulta evidente un'influenza dello stadio sulla congelabilità embrionale. In particolare, è stato dimostrato che gli stadi

embrionali avanzati (Bl, xBl e hBl) sono quelli più idonei alle procedure di vitrificazione in quanto mostrano, a 24h, una percentuale di sopravvivenza, come embrioni trasferibili, più alta rispetto agli stadi più precoci (TM e eBl). Quando sono stati considerati gli embrioni di qualità eccellente sul totale di quelli trasferibili, lo stadio con la percentuale più alta è risultato essere quello di Bl che, oltre a rappresentare il 52 % del totale degli embrioni di grado 1 a 24h, ha mostrato anche la maggiore percentuale di sopravvivenza (55 %) sia verso le TM e le hBl, che, tendenzialmente, verso le eBl e le xBl. La migliore congelabilità delle Bl con questa metodica di vitrificazione, è stata ulteriormente dimostrata dopo 48h di coltura post-riscaldamento, in cui è stato osservato che la percentuale di sopravvivenza delle Bl è maggiore di quella di tutti gli altri stadi di sviluppo embrionale sia che si prendano in considerazione gli embrioni trasferibili (42 %), sia i soli embrioni di grado 1 (19 %) sul totale dei vitrificati. Inoltre, la migliore qualità delle Bl è stata dimostrata dal fatto che il 60 % degli embrioni di grado 1 a 48h erano rappresentati dalle Bl, dato confermato anche dall'alto tasso di sopravvivenza registrato tra le 24 e le 48h, che è risultato essere del 91 % per le Bl e nettamente superiore rispetto agli altri stadi.

Visti i risultati ottenuti in vitro, abbiamo deciso di valutare le percentuali di gravidanza ottenibili dopo il trasferimento in animali

riceventi di embrioni vitrificati con questa metodica rispetto ad embrioni freschi. Le uniche gravidanze a termine dopo trasferimento di embrioni di bufalo IVP vitrificati sono quelle riportate da Duran e colleghi nel 2004; in questo lavoro, è stata riportata una percentuale di gravidanze del 16.4 % dopo trasferimento di embrioni vitrificati con una soluzione di GE al 40 % (v/v), ficoll al 18 % (p/v) e saccarosio 0.3 M, mentre dalla nostra esperienza è risultata una percentuale di gravidanze del 37.5 % (3/8) dal trasferimento di embrioni IVP vitrificati con la metodica utilizzata da noi precedentemente per valutare la sopravvivenza in vitro; delle 3 gravidanze ottenute, 2 sono esitate nella nascita di due vitelli bufalini (25 % di gravidanze a termine). Nessuna gravidanza è stata, invece, ottenuta dal trasferimento di embrioni freschi; questo risultato inatteso potrebbe essere spiegato da un problema tecnico verificatosi durante il trasporto degli embrioni dal laboratorio all'azienda in cui erano le riceventi. Gli embrioni erano stati caricati in paillette utilizzando il SOF, che necessita del 5 % di CO<sub>2</sub> per il mantenimento del pH ottimale. Allo scopo le paillette erano state poste in vacutainer, all'interno dei quali era stata insuflata la miscela gassosa richiesta durante la coltura (5 % CO<sub>2</sub>, 7 % O<sub>2</sub> e 88 % N<sub>2</sub>). La perforazione del tappo del vacutainer, e il conseguente danneggiamento dello stesso, al momento dell'insuflazione della miscela gassosa, potrebbe avere determinato delle degli scambi con

l'ambiente esterno, facendo variare il valore del pH; tale variazione è noto incidere negativamente sulla sopravvivenza degli embrioni. Questo inconveniente potrebbe essere superato impiegando dei contenitori a tenuta più idonei al trasporto, oppure un terreno più stabile in cui trasferire gli embrioni freschi prima di essere caricati nelle paillette da ET.

I recenti successi riportati da molti autori, in altre specie, con l'uso di nuove metodiche che sfruttano il principio dei volumi minimi di soluzione di vitrificazione per la crioconservazione degli embrioni, ci hanno spinto a verificare se l'uso delle OPS potesse incrementare la sopravvivenza in vitro anche di embrioni di bufalo IVP. Sulla base delle nostre conoscenze, l'uso di questa metodica per vitrificare embrioni di bufalo non è mai stato riportato prima e, per questo motivo, abbiamo deciso di utilizzare le OPS, oltre che con il protocollo originale ideato da Vajta e colleghi nel 1998 per gli embrioni di bovino, anche con quello da noi precedentemente usato con le tradizionali paillette da inseminazione. Tale scelta è stata motivata dal fatto che gli unici dati riportati sulla vitrificazione di embrioni IVP di bufalo, al momento della pianificazione sperimentale, sono stati ottenuti con l'impiego di questo protocollo. Dai nostri risultati è emerso che embrioni di bufalo prodotti in vitro possono essere vitrificati con successo mediante OPS e che anche, in questo caso, è evidente un effetto dello stadio di sviluppo:

nessuna delle TM vitrificate è sopravvissuta, mentre gli stadi di xBl e hBl sono risultati più criotolleranti in entrambi i protocolli impiegati. In particolare, osservando le percentuali di sopravvivenza ottenute con il protocollo precedentemente impiegato da Vajta e colleghi nel bovino, non è stato evidenziato un effetto dello stadio di sviluppo quando sono stati considerati gli embrioni di grado 1 e 2 sia a 24 che a 48h, mentre è stato osservato che la percentuale di embrioni di qualità eccellente sul totale dei sopravvissuti di grado 1 e 2 è risultata incrementata nel caso degli stadi più avanzati (44 e 50 % per le xBl e 58 e 73 % per le hBl rispettivamente a 24 e 48h). Questo dato è stato confermato dal fatto che sia a 24 che a 48h la maggioranza degli embrioni di grado 1 è rappresentato dalle xBl e dalle hBl. L'efficienza da noi ottenuta con l'uso di questo protocollo è risultata più bassa rispetto a quella riportata nel bovino da Vajta (Vajta et al. 1998), ma sovrapponibile a quella riportata nella specie suina (Cuello et al. 2004), specie in cui gli embrioni sembrano avere in comune con quelli bufalini l'alto contenuto lipidico. Per quanto riguarda i risultati ottenuti con l'applicazione del protocollo da noi usato precedentemente per vitrificare embrioni di bufalo IVP, questi hanno evidenziato, già da una prima analisi delle percentuali di sopravvivenza degli embrioni trasferibili sul totale dei vitrificati, un effetto dello stadio di sviluppo a favore delle xBl e delle hBl. Da un'analisi degli embrioni di grado 1 sui

trasferibili i dati più rilevanti sono la percentuale di sopravvivenza del 75 % per le xBl e del 69 % per le hBl, a 24h, dato che rimane pressoché invariato a 48h per lo stadio di xBl, mentre scende al 43 % per le hBl, dimostrando che le xBl sono lo stadio che conserva una qualità migliore anche dopo 48h di coltura.

Dal confronto dei due protocolli usati con le OPS sul totale degli embrioni, quindi senza tener conto dello stadio, non sono emerse differenze nella sopravvivenza, intesa come embrioni trasferibili (grado 1 e 2) ma, quando sono state considerate le percentuali di embrioni di qualità eccellente (grado 1) su quelli considerati trasferibili dopo la coltura, è risultata evidente una differenza a favore del protocollo dell'esperimento 1 rispetto al protocollo di Vajta a 24h (61 vs 30 %,  $P < 0.01$ ) e la stessa tendenza è stata osservata a 48h (57 vs 41 %,  $P = 0.08$ ). Inoltre, poiché all'interno di ciascun gruppo è stato osservato un effetto dello stadio, si è ritenuto opportuno operare un confronto degli embrioni dello stesso stadio tra i due gruppi. Quando l'effetto dei protocolli è stato confrontato su embrioni dello stesso stadio, le percentuali di sopravvivenza degli embrioni di grado 1 e 2, a 24h, sono state più alte per lo stadio di xBl vitrificato con il protocollo dell'esperimento 1 rispetto a quello di Vajta (58 vs 37 %), e questo dato è stato confermato e rafforzato dalla percentuale delle xBl di grado 1 sui totali trasferibili che è risultata del 75 % per il protocollo

dell'esperimento 1 rispetto al 44 % ottenuto con l'uso del protocollo di Vajta. Quindi, anche i risultati ottenuti con l'uso delle OPS con due diversi protocolli hanno confermato che gli stadi più avanzati sono più criotolleranti di quelli più precoci, e più in particolare che il raggiungimento di uno stadio avanzato in coltura è fondamentale ai fini della sopravvivenza post-riscaldamento.

La metodica più recente che sfrutta il principio dei volumi minimi di soluzione di vitrificazione è quella del Cryotop, metodica usata con successo per la prima volta nel 2005 da Kuwayama e colleghi per vitrificare oociti umani. Dalla sua ideazione ad oggi diversi autori hanno usato questa metodica per vitrificare embrioni di diverse specie (Esaki R. et al., 2004; Hochi S. et al., 2004), ma il suo impiego per vitrificare embrioni di bufalo e bovino è limitato ad un unico lavoro del 2005 (Laowtammathron C. et al. 2005). In questo ultimo la prova è stata limitata ad embrioni micromanipolati e la resistenza al congelamento è stata determinata solo per gli embrioni allo stadio di hBl. Si è, così, deciso di verificare se l'uso del Cryotop migliorasse la sopravvivenza in vitro di embrioni di bufalo e di bovino IVP e si è voluto verificare se lo stadio di sviluppo influenzasse la criotolleranza; anche in questo caso, sono stati usati gli stessi protocolli dei precedenti esperimenti discussi. È importante precisare che, nel caso degli embrioni bufalini, per questo esperimento il numero dei casi analizzati

è stato molto basso rispetto a quelli precedenti, a causa della scarsa reperibilità di materiale sperimentale, aggravata dal fatto che la prova è stata eseguita durante la stagione sfavorevole (primavera-estate), in cui si osserva un decremento ulteriore del numero degli oociti di partenza. Ciò non ha consentito di riscontrare una significatività statistica lì dove la differenza tra le percentuali di sopravvivenza esaminate era molto evidente. Dai nostri risultati è emerso che la vitrificazione mediante Cryotop degli embrioni di bufalo IVP con il protocollo precedentemente usato da Vajta e colleghi per vitrificare embrioni bovini (Vajta et al., 1998) ha evidenziato una buona resistenza in tutti gli stadi tranne che in quello di TM, mentre lo stadio che ha mostrato la maggiore percentuale di sopravvivenza, 71 % in termini di embrioni trasferibili sul totale dei vitrificati, è stato quello di xBl, risultato non sempre supportato dalla significatività statistica. Da questa prima analisi è risultato che lo stadio di xBl prima e quello di Bl poi hanno una migliore sopravvivenza rispetto alle TM e alle eBl, mentre le hBl hanno presentato valori intermedi di sopravvivenza. Ulteriori indagini hanno confermato la maggiore sopravvivenza delle xBl, che sono, infatti, risultate lo stadio che incide maggiormente sul totale degli embrioni di grado 1 (46 %) sia dopo 24 che 48h. Anche quando sono stati analizzati i dati relativi al protocollo da noi precedentemente impiegato nell'esperimento 1, è emerso un

andamento sovrapponibile a quello ottenuto con il protocollo di Vajta, evidenziando una peggiore sopravvivenza degli stadi più precoci. Il confronto dei due gruppi non ha evidenziato alcuna differenza statistica in tutti i parametri considerati; inoltre, anche quando sono stati confrontati i corrispondenti stadi tra i due gruppi, non si è osservata alcuna differenza. Conseguentemente, visto anche il basso numero di casi a nostra disposizione, abbiamo ritenuto opportuno accorpare tutti gli embrioni dello stesso stadio, senza tenere conto del protocollo impiegato, per indagare meglio, aumentando la casistica, l'effetto dello stadio di sviluppo. Ciò ci ha permesso di confermare che lo stadio di TM, e tendenzialmente quello di eBl, sono quelli più sensibili alla vitrificazione. Rispetto ai dati riportati da Laowtammathron C. e colleghi la sopravvivenza embrionale da noi ottenuta in toto è stata più bassa. E' opportuno precisare che l'efficienza generale riportata è stata fortemente penalizzata dalle ridotte percentuali di sopravvivenza degli stadi precoci; infatti se consideriamo le percentuali di sopravvivenza, come embrioni trasferibili, ottenute nel nostro lavoro con gli stadi più avanzati, come le xBl, con il protocollo di Vajta si è raggiunto il 71 %, dato non dissimile da quello riportato nel succitato lavoro, che aveva unicamente utilizzato blastocisti sgusciate da NT. È da precisare che, in questo ultimo esperimento, abbiamo osservato un maggior numero

di TM e ciò suggerisce una ridotta efficienza del sistema IVEP, imputabile, probabilmente, alla stagionalità riproduttiva della specie.

Anche nella vitrificazione mediante Cryotop degli embrioni bovini è stato evidenziato un effetto dello stadio di sviluppo sulla congelabilità embrionale; infatti, gli stadi embrionali più avanzati hanno mostrato una migliore resistenza al congelamento e in particolare lo stadio di xBl ha raggiunto una percentuale di sopravvivenza del 70 % sovrapponibile a quella ottenuta da Laowtammathron C. nella stessa specie. Inoltre, con gli embrioni bovini è stata evidenziata una differenza, dopo 24h di coltura post-riscaldamento, tra i due protocolli usati a favore del protocollo di Vajta, anche se questa differenza si è annullata dopo 48h di coltura. In ogni caso, in entrambi i protocolli lo stadio di xBl rappresenta da solo la metà di tutti gli embrioni di grado migliore sopravvissuti alla metodica di vitrificazione. A differenza di quanto riportato da Laowtammathron C., sulla minore efficienza del sistema cryotop nella specie bovina rispetto alla bufalina, i risultati del nostro lavoro hanno mostrato sopravvivenze sovrapponibili degli embrioni delle due specie.

Sebbene spesso i numeri non consentano di evidenziare differenze statistiche, compare un effetto dello stadio di sviluppo in tutti i casi esaminati. Il denominatore comune di tutti gli esperimenti è stata la

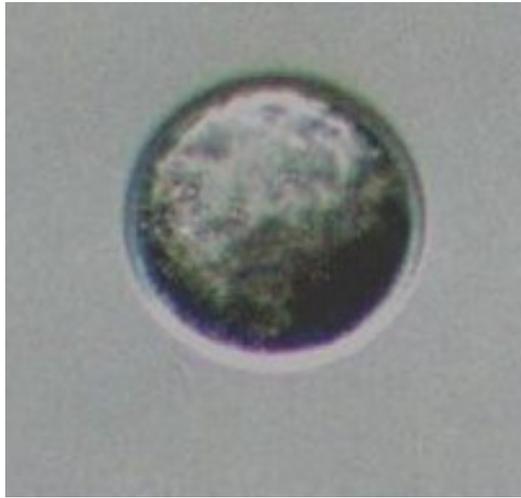
minore resistenza degli stadi precoci; lo stadio che è andato meglio, invece, è variato tra le metodiche. Ad esempio le BI sono risultate lo stadio migliore con il metodo tradizionale che utilizza le paillette, mentre con i due approcci con volumi minimi di soluzione di vitrificazione le xBI e le hBI sono stati gli stadi più criotolleranti.

L'influenza dello stadio di sviluppo sulla resistenza al congelamento è stata riportata da molti autori e in molte specie e sembra essere dovuta a caratteristiche intrinseche di ognuna di esse. Uno dei fattori che sembra influire sulla diversa resistenza al congelamento dei diversi stadi embrionali, è l'alto contenuto lipidico che si trova negli stadi più precoci rispetto a quelli più avanzati; infatti Dobrinsky et al. nel 1994 hanno dimostrato che morule suine di 5 giorni non sopravvivono alla crioconservazione, mentre blastocisti espanse al sesto giorno e blastocisti sgusciate al settimo sono in grado di sopravvivere e continuare lo sviluppo in vitro dopo vitrificazione/riscaldamento. E' possibile che, analogamente a quanto osservato negli embrioni di suino, la migliore congelabilità degli stadi avanzati, riportata in questo studio nella specie bufalina, sia imputabile alla minore presenza di lipidi in questi rispetto agli stadi più precoci. Questo dato non è stato dimostrato, ma può essere ipotizzato sulla base dell'aspetto mostrato da embrioni bufalini IVP, che dallo stadio di blastocisti in poi diventano leggermente più chiari

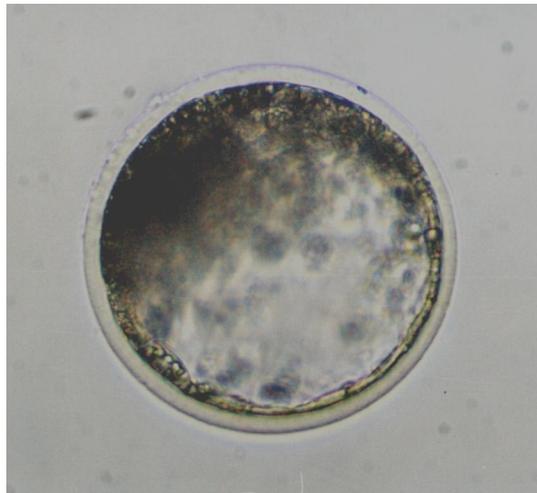
all'osservazione microscopica. Inoltre, come riportato anche da Vajta e collaboratori (Vajta et al., 1996), questo andamento potrebbe essere spiegato anche da differenze strutturali che rendono gli embrioni più avanzati meno sensibili alle procedure di vitrificazione e riscaldamento. D'altra parte, in uno studio sulla specie ovina, Naitana et al. (1996) hanno ipotizzato che la migliore efficienza di vitrificazione degli embrioni più avanzati nello sviluppo potrebbe essere dovuta ad una maggiore resistenza delle membrane cellulari agli stress osmotici e tossici dopo la formazione della blastocela, e all'aumento della attività ATPasi Na/K che si verifica nelle cellule del trofoblasto durante la formazione della blastocela (Watson et al., 1988); ciò determinerebbe un meccanismo di trasporto più attivo dei CP diminuendo il loro effetto tossico. Altri aspetti che possono influenzare questa minore resistenza al congelamento degli embrioni più precoci è la dimensione dei blastomeri; infatti, è stato riportato che le cellule di embrioni allo stadio precoce, leggermente più grandi di quelle degli stadi più avanzati, sono più sensibili agli stress osmotici indotti dalla rimozione dei crioprotettori (Tachikawa et al., 1993). Infine, come riportato da Overstrom et al. (1993), durante la vitrificazione, l'esposizione degli embrioni a soluzioni di CP altamente concentrate può anche produrre danni irreversibili all'organizzazione citoscheletrica degli embrioni, in particolare agli stadi più precoci.

In ogni caso, è bene precisare che, nel nostro studio, per evitare di disturbare le colture, si è deciso di valutare la resa embrionale in un unico momento e, pertanto, gli embrioni che sono stati trovati allo stadio precoce (TM e eBl) risultavano comunque essere embrioni ritardati. Ciò non ci consente, quindi, di poter attribuire la minore efficienza registrata agli stadi di TM ed eBl unicamente allo stadio di sviluppo perché potrebbe verosimilmente essere una semplice conseguenza della minore vitalità di tali embrioni, indicata dal loro ritardo nello sviluppo in coltura.

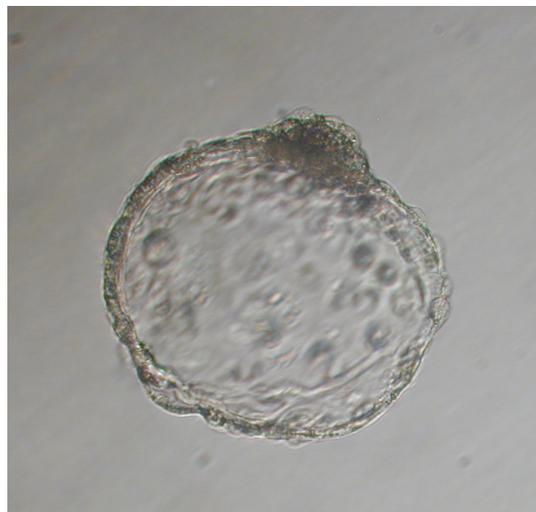
**Figura 8.** Blastocisti di bufalo vitrificata con la metodica descritta nell'esperimento 1.1 dopo 24h di coltura post-riscaldamento



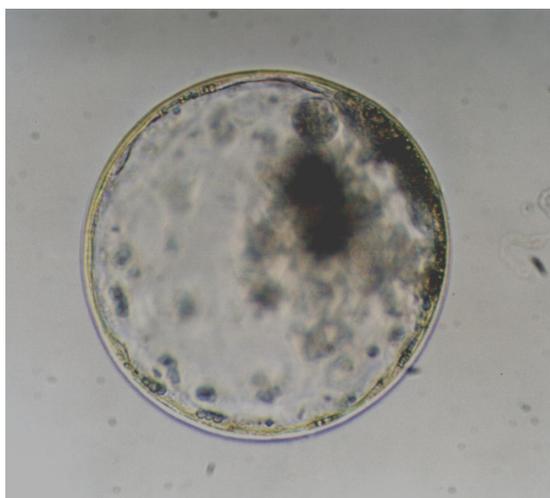
**Figura 9.** Blastocisti espansa di bufalo vitrificata con la metodica descritta nell'esperimento 2(Gruppo 2) dopo 24h di coltura post-riscaldamento



**Figura 10.** Blastocisti sgusciata di bufalo vitrificata con la metodica descritta nell'esperimento 3.1 (Gruppo 1) dopo 24h di coltura post-riscaldamento



**Figura 11.** Blastocisti espansa di bovino vitrificata con la metodica descritta nell'esperimento 3.2 (Gruppo 1) dopo 24h di coltura post-riscaldamento



## **CONCLUSIONI**

In questo lavoro è stata dimostrata la possibilità di crioconservare embrioni IVP di bufalo con tre diverse metodiche di vitrificazione e quelli di bovino con il metodo del cryotop. Con tutti i metodi e con tutti i protocolli esaminati è emerso un effetto dello stadio di sviluppo, con la peggiore sopravvivenza registrata per gli embrioni vitrificati agli stadi precoci. Un altro modo di interpretare tale risultato è che gli embrioni che, al giorno 7 di coltura in vitro, non hanno raggiunto almeno lo stadio di blastocisti, resistono peggio alla crioconservazione.

Allo scopo di poter giungere a delle conclusioni sulle metodiche impiegate è opportuno confrontare i risultati ottenuti con i vari metodi, eliminando le morule, che sono lo stadio risultato più sensibile in tutte le procedure adoperate.

Dall'insieme dei risultati ottenuti sembrerebbe che su tutti i metodi testati quello che consente di ottenere i migliori risultati è il metodo del cryotop con il protocollo precedentemente usato da Vajta per vitrificare embrioni di bovino mediante le OPS, che ha dato percentuali di sopravvivenza in toto del 68 % e di sopravvivenza, intesa come embrioni trasferibili, del 58 %.

In realtà, un confronto diretto non è stato effettuato; una comparazione dei tre strumenti utilizzati nel corso del lavoro è stata

possibile limitatamente al protocollo utilizzato da Neglia et al. che, però, ha dato i risultati peggiori con il cryotop. Infatti, confrontando le percentuali di sopravvivenza ottenute con i tre strumenti non emergono grosse differenze, sebbene un'efficienza leggermente superiore è stata osservata con il metodo delle OPS (37 %, 47 % e 43 % rispettivamente per le paillette, OPS e Cryotop). Quando, invece, abbiamo testato i due strumenti che utilizzano volumi minimi di vitrificazione, è stato anche effettuato un confronto dei due protocolli. Sebbene il numero dei casi non consenta di trarre conclusioni definitive, l'andamento dei risultati indicherebbe che la migliore efficienza è stata ottenuta adoperando il metodo delle OPS con il protocollo di Neglia e quello del Cryotop con il protocollo di Vajta. Con questo ultimo, le percentuali di sopravvivenza di embrioni trasferibili sono state del 58 % vs il 41 % per il Cryotop e le OPS rispettivamente. Un risultato interessante è stato, inoltre, quello ottenuto con le xBl con il metodo Cryotop e il protocollo di Vajta che hanno mostrato una percentuale di sopravvivenza di embrioni trasferibili del 71 % e, dato ancora più importante, una percentuale di embrioni di grado eccellente del 59 %. Impiegando le OPS con il protocollo di Neglia le xBl, che hanno dato risultati migliori, hanno mostrato percentuali di sopravvivenza, in termini di embrioni trasferibili, del 58 %. La migliore efficienza del metodo Cryotop con il protocollo Vajta è presumibilmente

riferibile sia all'aumento ulteriore della velocità di raffreddamento (22800°C/min vs 16340°C/min) e, soprattutto di riscaldamento (42100°C/min vs 13900°C/min), grazie alla riduzione drastica del volume impiegato (< 0.1 µl vs circa 1 µl), sia alla combinazione di CP impiegata, DMSO e GE, che permette un aumento della permeabilità del GE, considerato universalmente il CP meno tossico.

Alla luce di quanto detto, si può concludere che il migliore approccio da utilizzare per la crioconservazione degli embrioni IVP di bufalo sembrerebbe essere il cryotop come strumento di vitrificazione, ed il protocollo di Vajta come combinazione di CP, e che è preferibile crioconservare solo gli stadi più avanzati di sviluppo. I risultati sulla sopravvivenza in vitro ottenuti con questo metodo, in particolare con le xBl, sono molto promettenti e lascerebbero supporre che tale approccio possa migliorare la percentuale di gravidanze a termine dopo il trasferimento in animali riceventi. In studi futuri, sarà quindi necessario valutare la capacità dell'embrione vitrificato/riscaldato di svilupparsi in un individuo a termine, poiché questo rappresenta il miglior parametro per stabilirne la qualità.

È importante precisare che l'ottimizzazione della crioconservazione degli embrioni IVP, in questa specie, è strettamente connessa all'efficienza del sistema di coltura; infatti, la presenza di embrioni ritardati al settimo giorno di coltura, indica una limitazione insita nel

sistema impiegato. In altri termini crioconservando embrioni avanzati è possibile ottenere un'efficienza elevata ma, così operando, si riduce il numero di embrioni effettivamente congelabili. Ne consegue che, affinché la tecnologia della crioconservazione embrionale in questa specie sia utilizzabile in campo, al di là degli sforzi indirizzati al miglioramento delle tecniche di crioconservazione, è necessario che l'attenzione dei ricercatori vada anche rivolta all'ottimizzazione delle condizioni colturali in vitro, che porterebbe alla produzione di embrioni di migliore qualità e, quindi, maggiormente resistenti alla crioconservazione.

## **BIBLIOGRAFIA**

Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. 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.* 2002 Jan;61(1):57-66;

Abd El Razek IM, Charpigny G, Kodja S, Marquant-Leguienne B, Mermillod P, Guyader-Joly C et al. Differences in lipid composition between in vivo and in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2000; 53: 346;

Ali J and Shelton JN. Design of vitrification solutions for the cryopreservation embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99: 471-477;

Aman RR and Parks JE. Effects of cooling and rewarming of the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 1994; 50: 103-110;

Arav A. Vitrification of oocytes and embryos. In: Lauria A, Gandolfi F eds, *New Trends in Embryo Transfer*, Portland Press, Cambridge UK, 1992; 255-264;

Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002 ; 187: 77-81;

Asada M, Ishibashi S, Ikumi S Fukui Y. Effect of polyvinyl alcohol (PVP) concentration during vitrification of in vitro matured oocytes. *Theriogenology* 2002; 58: 1199-1208;

Bacci ML, Galeati G, Mattioli M, Boni R, Seren E. In vitro maturation and in vitro fertilization of buffalo oocytes. *Proc III World Buffalo Congress, Varna, 1991:599-603;*

Baril G, Casamitjana P, Perrin J and Vallet JC. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthygiene (Berlin)* 1989; 24: 101-115; 31;

Baril G, Traldi AL, Cognie Y, Lebeouf B, Beckers JF and Mermillod P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology* 2001; 56: 299-305;

Baruselli PS, de Sa Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bo GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2006 Jan 7; 65 (1): 77-88;

Baust JG. Biochemical correlates to cold hardening in insects. *Cryobiology* 1981; 27: 401-415;

Berthelot F, Martinat-Botte F, Locatelli A, Perreau C and Terqui M. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology* 2000; 41: 116-124;

Bielanski A and Hare WCD. Survival in vitro of bovine demi-embryos after freezing by slow cooling rates and vitrification. *Theriogenology* 1988; 29: 223;

Bielanski A, Nandin-Davis S, Sapp T and Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2000; 40: 110-116;

Bondioli KR, Westhusin ME and Looney CR. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 1990; 33: 165-174;

Boni R, Santella L, Dale B, Roviello S, Di Palo R, Barbieri V. M. An ultrastructural study of maturation in buffalo oocytes. *Acta Medica Veterinaria* 1992;38:153-161;

Boni R, Wurth YA, Roviello S, Barbieri V, Kruip TH.A.M. Effetto della distanza tra prelievo e recupero sulle caratteristiche morfologiche e sull'efficienza di produzione embrionale in vitro di oociti prelevati mediante Ovum Pick-up. *Proc. XLVII S.I.S.Vet* 1993. 1: 475-480;

Boni R. In vitro production in bovine and buffalo species. *Buffalo J.* 1994; supplement 2:147-160;

Boni R, Roviello S, Barbieri V, Zicarelli L. In vitro embryo production in buffalo species. *Atti XLVIII Convegno Nazionale SISVET* 1994b;1:307-312;

Boni R, Rovello S and Zicarelli L. Repeated Ovum Pick-Up in italian mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 1996; 46: 899-906;

Boni R, Roviello S, Gasparri B, Langella M, Zicarelli L. In vitro production of buffalo embryos in chemically defined medium. *Buffalo J* 1999;1:115-120;

Bracke C and Niemann H. New aspect in the freezing of embryos from livestock. In: Proc. 11th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association. Fondation Marcel Mérieux, Lyon France 1995; 101-111;

Caracciolo di Brienza V, Squires EL, Zicarelli L, Carnevale EM. Establishment of pregnancies after vitrification of equine embryos. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16: 165;

Chantaraprateep P, Lohachit C, Techakumphu M, Kobayashi G, Virakul P, Kunayongkrit A, Prateep P, Limskul A. Early embryonic development in thai swamp buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Theriogenology* 1989;31, No. 6:1131-1139.

Chauhan MS, Katiyar PK, Singla SK, Manik RS, Madan ML. Production of buffalo calves through in vitro fertilization. *Ind J Anim Sci* 1997a; 67: 306-308;

Chauhan MS, Palta P, Das SK, Katiyar P, Madan ML. Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: effect on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro. *Theriogenology* 1997c; 48: 461-469.

Chauhan MS, Singla SK, Manik RS, Madan ML. Increased capacitation of buffalo sperm by heparin as confirmed by electron microscopy and in vitro fertilization. *Ind J Exp Biol* 1997d; 35: 1038-1043;

Chauhan MS, Singla SK, Palta P, Manik RS, Madan ML. In vitro maturation and fertilization, and subsequent development of buffalo (*Bubalus Bubalis*) embryos: effects of oocytes quality and type of serum. *Reprod Fertil Dev* 1998a;10:173-177;

Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reproduction* 2001;11: 2350-2356;

Cho HJ, Son WY, Yoon SH, Lee SW, Lim JH. An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Human Reproduction* 2002; 17: 2419-2422;

Choi DH, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Cha KY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified blastocysts in an IVF-ET program. *Fertility and Sterility* 2000; 74: 838-839;

Chuangsoongneon U, Kamonpatana M. Oocyte maturation, in vitro fertilization and culture system for developing preimplantation Swamp buffalo embryos using frozen-thawed semen. *Buffalo J* 1991;7:189-198;

Cocero MJ, Lopez Sebastian A, Barragan ML and Picazo RA. Differences on post-thawing survival between ovine morulae and

blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology* 1996; 33: 502-507;

Cuello C, Antonia Gil M, Parrilla I, Tornel J, Vazquez J.M, Roca J, Berthelot F, Martinat-Botté F, Martinez E.A. Vitrification of porcine embryos at various stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology* 2004; 62: 353-361;

Danell B. Oestrus Behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. PhD thesis, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, Sweden 1987;

Dattena M, Ptak G, Loi P. and Cappai P. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. *Theriogenology* 2000; 53: 1511-1519;

dela Pena EC, Takahashi Y, Atabay EC Katagiri S, Nagano M. Vitrification of mouse oocytes in ethylene glycol-raffinose solution: effects of preexposure to ethylene glycol or raffinose on oocyte viability. *Cryobiology* 2001; 42: 103-111;

De La Torre-Sanchez JF, Gardner DK, Preis K, Gibbons J, Seidel GE jr. Metabolic regulation of in vitro-produced bovine embryos. II. Effects of three metabolic regulators during post-compaction development. *Reprod Fertil Dev*, 2006;18(5):597-607;

de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes

and its effect on embryo development and freezability. *Molec Reprod Dev* 1996;45:451-457 ;

de Matos DG, Furnus. CC. The importance of having high glutathione level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of  $\beta$ -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000;53 (3):761-771;

Dobrinsky J.R. and Johnson LA. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: a study of in vitro development. *Theriogenology* 1994; 42: 25-35;

Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 1996; 45: 17-26;

Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR. and Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* 2000; 62: 564-570;

Drost M, Elsdon RP. Blastocyst development in water buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Theriogenology* 1985;23:191;

Drost M, Ambrose JD, Thatcher MJ, Cantrell CK, Wolfsdorf KE, Hasler JF, Thatcher WW. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology*. 1999 Nov; 52(7):1161-7.

Duman JG. Insects antifreezes and ice-nucleating agents. *Cryobiology* 1982; 19: 613-627;

Duran DH, Pedro PB, Venturina HV, Hufana RD, Salazar AL, Duran PG. and Cruz LC. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of in vitro-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Theriogenology* 2004; 61: 1429-1439;

Elder K. and Brian D. Cryopreservation In: *In vitro fertilization*. 2<sup>nd</sup> edition. Cambridge University Press, 2000: 192-228;

El Gayar M. and Holtz W. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *J. Anim. Sci.* 2001; 79: 2436-2438; 129;

Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, Ushijima H, Kuwayama M, Nagashima H. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod* 2004 Aug; 71(2): 432-7;

Fountain D, Ralston M, Higgins N, Gorlin JB, Uhl L, Wheeler C, Antin JH, Churchill WH. and Benjamin RJ. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion*. 1997; 37: 585-591;

Galli C, Duchi R, Crotti G. and Lazzari G. Embryo production by Ovum Pick-up in Water Buffalo. *Theriogenology* 1998; 50: 259;

Gardner DK, Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum free media. *Human Reprod* 1998 Jun;13 Suppl 3:148-59;

Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L. Effect of cysteamine during in vitro maturation in buffalo embryo development. *Theriogenology* 2000; 54: 1537–1542;

Gasparrini B. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. Proc. Annual Conference International Embryo Transfer Society, Foz do Iguassu, Parana, Brasil. *Theriogenology* 2002; 57: 237-256;

Gasparrini B, Sayoud H, Neglia G, de Matos D, Donnay I, Zicarelli L. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 2003; 60: 943-952;

Gustafsson H., Jaakma U. and Shamsudin M. Viability of fresh and frozen-thawed biopsied bovine embryos. *Acta Vet. Scand.* 1994; 35: 217-222;

Hasler, J.F.; Bilby, C.R.; Collier, R.J.; Denham, S.C.; Lucy, M.C. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program 2003 May;59(9):1919-28 ;

Hamawaki A, Kuwayama M, Hamano S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology* 1999; 51: 165.

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian perm: what we ask them to survive. *J Androl.* 1990 Jan-Feb;11(1):73-88;

Hayashi S, Kobayashi K, Mizuno J, Saitoh K. and Hirano S. Birth of piglets from frozen embryos. *Vet. Rec.* 1989; 125: 43-44;

Herman HA, Mitchell JR. and Gordon AD. Extenders and extension of semen. *Artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle: a handbook and laboratory manual.* Danville I.L.: Interstate Publishers 1994: 101-116;

Herr CM. and Reed KC. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* 1991; 35: 45-54;

Hochi S, Fujimoto T, Choi YH, Braun J. and Oguri N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1994; 42: 483-488;

Hochi S, Fujimoto T. and Oguri N. Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995; 7: 113-117;

Hochi S, Terao T, Kamei M, Kato M, Hirabayashi M, Hirao M. Successful vitrification of pronuclear stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology* 61:267-275, 2004;

Hollingsworth TS. and Page RD. The effect of microencapsulation on freezing bisected bovine embryos. *Theriogenology* 1988; 29: 262;

Holm P, Vajta G, Macháty, Z. Open Pulled Straw (OPS) vitrification of porcine blastocysts: simple procedure yielding excellent in vitro survival but so far no piglets following transfer. *Cryo-Letters* 1999; 20: 307-310;

Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Perez-Sanchez F, Grishchenko V. Links Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 1998 May; 36(3): 250-3;

Isachenko V, Alabart JL, Vajta G. Double cryopreservation of rat embryos at different developmental stages with identical vitrification protocol: the not properly understood phenomenon. In: Abstracts of the Winter Meeting of Society for the Study of Fertility. Utrecht, Holland. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000; 26: Abstract 10;

Isachenko V, Alabart JL, Dattena M, Nawroth F, Cappai P, Isachenko E, Cocero MJ, Olivera J, Roche A, Accardo C, Krivokharchenko A, Folch J. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology* 2003 Mar; 59(5-6): 1209-18;

Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Zaeva V, Krivokharchenko I, Shafei R, van der Ven H. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Hum Reprod.* 2005; Feb; 20(2):492-6;

Isachenko V, Montag M, Isachenko E, van der Ven H. Vitrification of mouse pronuclear embryos after polar body biopsy without direct contact with liquid nitrogen. *Fertil Steril*. 2005 Oct; 84(4):1011-6;

Ishimori H, Takahashi Y, Kanagawa H. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. *Theriogenology* 1992a; 37: 481-487;

Ishimori H, Takahashi Y, Kanagawa H. Factors affecting survival of mouse blastocysts vitrified by a mixture of ethylene glycol and dimethylsulfoxide. *Theriogenology* 1992b; 38: 1175-1185;

Ishimori H, Saeki K, Inai M. et al. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology* 1993; 40: 427-433;

Iwasaki S, Nakahara T. Incidence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass among bovine blastocysts fertilized in vitro. *Theriogenology* 1990 Oct; 34(4): 683-90;

Janssen-Caspers H.A.B, Wladimiriff J.W, Van Gent I, Alberga A.Th, Leerentveld RA, Zeilmaker GH, Drogendijk AC. Ultrasonically guided percutaneous and transvaginal follicle aspiration; a comparative study. *Human reproduction*, 1988; 3: 337-339;

Jainudeen MR, Takahashi Y, Nihayah M, Kanagawa H. In vitro maturation and fertilization of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Anim Reprod Sci* 1993; 31: 205-212;

Jian Ts, Sheng YN, Shun SD, Huan LK, Tan SJ, Yang NS, Shi DS, Lu KH. Application of bovine in vitro fertilization procedures to buffalo. J Guangxi Agril University 1998; 17: 312-317;

Karaivanov C, Vlahov K, Petrov M, Kacheva D, Stojanova M, Alexiev A, Polihronov O, Danev A. Studies on preimplantation development of buffalo embryos. Theriogenology 1987; 28 (5):747-753;

Kasai M. Nonfreezing technique for short-term storage of mouse embryos. Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer, 1986, 3: 10-14;

Kasai M, Komi JH, Takakamo A. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. Journal of Reprod and Fertil 1990; 89: 91-97, 1990;

Kasai M, Nishimori M, Zhu SE Sakurai T, Machida T. Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures. Biology of Reproduction 1992; 47: 1134-1139;

Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Sakurai T. and Edashige K. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. Cryobiology 1996; 33: 459-464;

Kasai M. Vitrification: refined strategy for the cryopreservation of mammalian embryos. Journal of Mammalian Ova Research 1997; 14: 17-28;

Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed Online* 2004 Aug; 9(2): 164-70;

Knight CA. and Duman JG. Inhibition of recrystallization of ice by insects thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology* 1986; 23: 256-262;

Kong IK, Lee SI, Cho SG, Cho SK, Park CS. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology* 2000 Jun; 53(9):1817-26;

Kuleshova LL, Shaw JM. A Strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. *Hum Reprod.* 2000 Dec;15(12): 2604-9;

Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO. Studies of replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 2001; 43: 21-31;

Kumar A, Solanki VS, Jindal SK, Tripathi VN, Jain GC. Oocytes retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. *Anim. Reprod. Sci.* 1997;47:189-195;

Kuwayama M. In straw dilution of bovine IVF-blastocysts cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1994; 41: 231;

Kuwayama M, Kato O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2000; 17, 477;

Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005 Sep; 11(3):300-8;

Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Vitrification of human embryos using the CryoTip™ method. *Reproductive BioMedicine Online* 2005 Nov; 11(5): 608-14;

Lane M, Schoolcraft WB. and Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.* 1999; 2: 1073-1078;

Laowtammathron C, Lorthongpanich C, Ketudat-Cairns M, Hochi S, Parnpai R. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology* 2005; 64: 1185–1196;

Lazar L, Spak J and David V. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology* 2000; 54: 571-578;

Leboeuf B, Manfredi E, Boue P, Piacère A, Brice G, Baril G, Broqua C, Humblot P. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Production Science* 1998; 55 (3): 193-203;

Lehn-Jenson H. and Willasden SM. Deep-freezing of cow half and quarter embryos. *Theriogenology* 1983; 15: 427-432;

Leibo SP. Preservation of ova and embryos by freezing. In: Brackett BG, Seidel Jr GE, Seidel SM, editors. *New technologies in animal breeding*. New York: Academic Press 1981; 127-139;

Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984; 21: 767-790;

Leibo SP and Loskutoff M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1993; 39: 81-94;

Leibo SP. and Oda K. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Cryo-letters* 1993; 14: 133-144;

Leibo SP, Martino A, Kobayashi S, Pollard JW. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Science*, 1996; 42: 45-53;

Lenz S, Leeton J, Renou P. Transvaginal recovery of oocytes for in vitro fertilization using vaginal ultrasound. *Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer* 1987, 4: 51-55;

Le Van Ty, Chupin D, Draincourt DA. Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. *Anim. Reprod. Sci.* 1989 ; 19: 171-178;

Lin TP, Sherman JK. and Willett EL. Survival of unfertilized mouse eggs in media containing glycerol and glycine. *J. Exp. Zool.* 1957; 134: 275-291;

Li R, Cameron AWN, Batt PA. and Trounson AO. Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Reprod. Fert. Dev.* 1990; 2: 345-350;

Lopez-Bejar M, Lopez-Gatius F. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology* 2002; 58, 1541-1552;

Low BG, Takahashi Y. and Kanagawa H. Viability of frozen-thawed mouse blastocysts with different number of dead cells. *Theriogenology* 1986; 25: 675-680;

Madan ML, Chauhan MS, Singla SK, Manik RS. Pregnancies established from water buffalo (*Bubalus Bubalis*) blastocysts derived from in vitro matured, in vitro fertilized oocytes and co-cultured with cumulus and oviductal cells. *Theriogenology* 1994a; 42:591-600.

Madan ML, Singla SK, Chauhan MS, Manik RS. In vitro production and transfer of embryos in buffaloes. *Theriogenology* 1994b; 41: 139-143;

Madan ML, das SK, Palta P. Application of reproductive technologies to buffaloes. *Anim Reprod Sci* 1996;42:299-306;

Martinez AG. and Matkovic M. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 1998; 49: 1039-1049;

Martino A, Pollard A. and Leibo SP. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Devel.* 1996a; 45: 503-512.

Martino A, Songsasen N. and Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 1996b; 54: 1059-1069;

Massip A, Van Der Zwalben P, Scheffen B. and Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 1986; 7: 270-273;

Massip A, Mermillod P. and Dinnyés A. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum. Reprod.* 1995; 10: 3004-3011;

Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 2001; 42, 139-144;

Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 1984; 247: C125-C142;

McGinnis LK, Duplantis SC JR. Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. *Anim Reprod Sci* 1993; 30: 273-280;

Meur S. K, Roy SB, Mohan G, Dhoble RI. Cryogenic changes in seminal proteins of cattle and buffalo. *Theriogenology* 1988; 30: 1005-1010;

Misra AK. Application of biotechnologies in buffalo breeding in India. *Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes, Caserta, Italy, 1997: 141-166;*

Moussa M, Bersinger I, Doligez P, Guignot F, Duchamp G, Vidament M, Mermillod P, Bruyas J-F. In vitro comparison of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 2005; 64: 1619-1632,

Naitana S, Loi P, Ledda S, Cappai P, Dattena M, Bogliolo L. and Leoni G. Effect of biopsy and vitrification of ovine embryos at different stages of development. *Theriogenology* 1996; 46: 813-824;

Naitana S, Ledda S, Loi P. Leoni G, Bogliolo L, Dattena M, Cappai P. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Animal Reprod Science* 1997;48: 247-256;

Nandi S, Chauhan MS, Palta P. Effect of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo (*Bubalus Bubalis*) oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1998; 50: 1251-1262;

Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF. and Nottle MB. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod.* 1994; 51: 618-622;

Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG. and Nottle MB. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature* 1995; 374: 416;

Neglia G, Marino M, Di Palo R, Wilding M, Caracciolo di Brienza V, Dale B, Gasparri B, Zicarelli L. A comparison of in vitro maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. 27<sup>th</sup> Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Omaha, Nebraska, USA, Jan 13–16, 2001. *Theriogenology* Jan 2001; 55: 488;

Neglia G, Gasparri B, Caracciolo di Brienza V, Campanile G, Spadetta M. e Zicarelli L. Cryopreservation of in vitro produced buffalo and bovine embryos by vitrification. *Proceedings VI World Buffalo Congress, Maracaibo, Venezuela, 2001, 155-159;*

Neglia G, Gasparri B, Caracciolo di Brienza V, Di Palo R, Campanile G, Presicce GA, Zicarelli L. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 2003 Mar; 59(5-6): 1123-30;

Niemann H, Brem G, Sacher B, Smidt D. and Krausslich H. An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day 7 bovine embryos. *Theriogenology* 1986; 25: 519-524;

Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology* 1991; 35: 109-124;

Oberstein N, O'Donnovan MK, Bruemmer JE, Seidel GE, Carnevale EM, and Squires EL. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop or conventional slow cooling methods. *Theriogenology* 2001; 55: 607-613;

Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, Tomogane H. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of in vitro-derived bovine blastocysts. *Anim Reprod Sci.* 1997 Jul; 48(1): 27-36;

Ocampo MB, de Asis AT, Ocampo LC, Kanagawa H. Histological observation of follicular atresia in Swamp buffalo. *Buffalo Bull* 1994; 13:51-55;

O'Kearney-Flynn M, Wade M, Duffy P, Gath V, Boland MP, and Dobrinsky JR. Effect of cryopreservation on IVP cattle embryo development in vitro and in vivo. *Theriogenology* 1998; 49: 178;

Oriol JG, Betteridge KJ, Hardy J, and Sharom FJ. Structural and developmental relationship between capsular glycoproteins of the horse (*Equus caballus*) and the donkey (*Equus asinus*). *Equine Vet. Sci.* 1993, Suppl. 15: 14;

Overstrom EW, Duby RT, Dobrinsky JR, Robl JM, Baguisi A, Lonergan P, Duffy P, Walsh JH, Roche JF, Boland MP. Cytoskeletal damage in vitrified and frozen embryos. *Theriogenology* 1993; 39: 276;

Palasz AT, Tan L, Del Campo MR and Mapletoft RJ. Freezing of mouse and bovine embryos in one-step straw. *Theriogenology* 1992; 37: 270;

Palta P, Banzal N, Prakash BS, Manik RS, Madan ML. Endocrinological observation of atresia in individual buffalo ovarian follicles. *Ind J Anim Sci* 1998; 68: 444-447;

Papis K, Shimizu M. and Izaike Y. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine in vitro matured oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 1999; 51: 173;

Papis K, Shimizu M. and Izaike Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000, 54: 651-658;

Perloff WH, Steinberger E. and Sherman JK. Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technic. *Fertil. Steril.* 1964; 15: 501-504;

Picard L, Schneider U, Betteridge KJ. and King WA. Effects of the zona pellucida, agar embedding and culture on the survival of micromanipulated bovine embryos after freezing and thawing. *J. In Vitro Fertil. Emb. Transf.* 1988; 5: 268-274;

Polge C, Smith AU. and Parks AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 666;

Pollard JW and Leibo S. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Theriogenology* 1993; 39: 287;

Ptak G, Dattena M, Loi P, Tischner M. and Cappai P. Ovum pick-up in sheep: efficiency of in vitro embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology* 1999; 52: 1105-1114;

Pugh PA, Tervit HR. and Niemann H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 58: 9-22;

Rall WF. and Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-575;

Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987; 24: 387-402;

Rall WF. 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, 2001, 173-187;

Ravindranatha BM, Nandi S, Gupta PSP, Sarma PV. Comparision of three different media on maturation of buffalo oocytes in vitro. *Ind J Anim Sci* 2001; 71: 841-843;

Rayos AA, Takashi Y, Hishinuma M. and Kanagawa H. Quick freezing of one-cell mouse embryos using ethylene glycol with sucrose. *Theriogenology* 1992; 37: 595-603;

Riha J, Landa V, Kneissl J, Matus J, Jindra J. and Kloucek Z. Vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after nonsurgical transfer. *Zivoc. Vir.* 1991; 36: 113-120;

Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2002 Jul; 62(3):320-7;

Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod.* 2003 Jan; 68(1): 236-43;

Rottem S, Cirillo VP, de Kruyff B, Shinitzky M, Razin S. Cholesterol in mycoplasma membranes. Correlation of enzymic and transport activities with physical state of lipids in membranes of *Mycoplasma mycoides* var. *capri* adapted to grow with low cholesterol concentrations. *Biochim Biophys Acta.* 1973 Nov 16;323(4): 509-19;

Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C. and Suzuki T. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step dehydration. *Theriogenology* 1996; 46: 331-343;

Salt RW. Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing. *Can. Entomol.* 1957; 89: 491-494;

Samad HA, Nasser AA. A quantitative study of primordial follicles in buffalo heifer ovaries. *Compendium* 13, FAO Int. Course on Animal Reproduction, Sweden, 1979;

Samad HA, Khan IQ, Rehman NU, Ahamad N. The recovery, in vitro maturation and fertilization of Nili-Ravi buffalo follicular oocytes. *Asian Aust J Anim Sci* 1998;11:491-497.

Samper JC. Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Anim Reprod Sci.* 2001 Dec 3; 68(3-4): 219-28;

Schneider U. Cryobiological principles of embryo freezing. *J. In Vitro Fertil.* 1986: 269;

Skryszowska M. and Smorag M. Cell loss in bisected mouse, sheep and cows embryos. *Theriogenology* 1989; 32: 115-122;

Singleton WL. State of the art in artificial insemination of pigs in the United States. *Theriogenology.* 2001 Nov 1; 56(8): 1305-10;

Scheffen B, Van der Zwalm P. and Massip A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-letters* 1986; 7: 260-269;

Shaw JM, Kola I, MacFarlan DR. and Trounsen AO. A association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J. Reprod. Fertil.* 1991; 91: 9-18;

Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology* 1997; 35: 219-229;

Sherman JK. and Bunge RG. Observations on preservation of human spermatozoa at low temperatures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1953; 82: 686-688;

Sherman JK. and Lin TP. Effect of glycerol and low temperature on survival of unfertilized mouse eggs. *Nature* 1958; 181: 785-786;

Slade NP, Takeda T, Squires EL, Elsdon RP. and Seidel GE. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. *Theriogenology* 1985; 24: 45;

Doetsch RN. Lazzaro Spallanzani's Opuscoli of 1776. *Bacteriol Rev.* 1976 Jun;40(2):270-5;

Somme L. Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comp. Biochem. Physiol.* 1982; 73: 519-543;

Sommerfeld V. and Niemann H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 1999; 38: 95-105;

Son WY, Lee SY, Chang MJ, Yoon SH, Chian RC, Lim JH. Pregnancy resulting from transfer of repeat vitrified blastocysts produced by in vitro matured oocytes in patient with polycystic ovary syndrome. *Reproductive BioMedicine Online* 2005; 10, 398-401;

Songsasen N, Buckrell BC, Plante C. and Leibo SP. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. *Cryobiology* 1995; 32: 78-91;

Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, Rall WF, Pitt RE, Lin TT, MacIntyre RJ. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*. 1990 May 10; 345(6271): 170-2;

Squires EL, McCue PM, Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*. 1999 Jan 1; 51(1): 91-104.

Storey KB. and Storey JM. Frozen and alive. *Scientific American* 1990; 12: 92-97;

Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T, Kasai M. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. *Molec Reprod Develop* 1993; 34: 266-271;

Takashi Y, Hishinuma M. and Kanagawa H. Quick freezing of one-cell mouse embryos using ethylene glycol with sucrose. *Theriogenology* 1992; 37: 595-603;

Tecirlioglu RT, French AJ, Lewis IM, Vajta G, Korfiatis NA, Hall VJ, Ruddock NT, Cooney MA, Trounson AO. Birth of a cloned calf derived from a vitrified hand-made cloned embryo. *Reprod Fertil Dev*. 2004; 15(7): 361-6;

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson L.E. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 1972; 30 (3): 493-497;

Thibier M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.* 200; 45: 235–242;

Thibier M. 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* 2004; 22(4): 12–9;

Totey SM, Singh G, Taneja M, Pawshe CH, Talwar GP. In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus Bubalis*). *J Reprod Fertil* 1992; 95: 597-607;

Totey SM, Pawshe CH, Singh GP. Effects of bull and heparin, and sperm concentrations on in vitro fertilization of buffalo (*Bubalus Bubalis*) oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1993a; 39:887-898;

Totey SM, Pawshe CH, Singh GP. In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes (*Bubalus Bubalis*): effects of media, hormones and sera. *Theriogenology* 1993b;39:1153-1171;

Totey SM, Daliri M, Appa Rao KBC, Pawshe CH, Taneja M, Chillar RS. Differential cleavage and developmental rates and their correlation with cell number and sex ratios in buffalo embryos generated in vitro. *Theriogenology* 1996;45:521-533;

Totey SM, Daliri M, Appa Rao KB, Pawshe CH, Taneja M, Chillar RS. Differential cleavage and developmental rates and their correlation with cell numbers and sex ratios in buffalo embryos generated in vitro. *Theriogenology*. 1996 Jan 15; 45(2): 521-33;

Traldi AS, Leboeuf B, Cognie Y, Poulin N. and Mermillod P. Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 1999; 51: 257;

Traldi AS. Vitrification of goat in vivo and in vitro produced embryos. In: Proc. 7th Int. Conf. Goats. Tours, France. 2000: 1031;

Tsunoda Y, Tokmagy T, Okubo Y. and Sugie T. Beneficial effect of agar for the frozen storage of bisected embryos. *Theriogenology* 1987; 28: 317-322;

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in straw-straw rehydration. *Animal Reproduction Science* 1996; 45: 191-200;

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Survival and development of in vitro produced bovine blastocysts following assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration. *J Reprod and Fertil* 1997a; 111: 65-70;

Vajta G, Holm P, Greve T. and Callesen H. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. *Acta Vet. Stand.* 1997b; 38: 349-352;

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T. and Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1998; 51: 53-58;

Vajta G, Murphy CN, Machaty Z, Prather RS, Greve T, Callesen H. In straw dilution of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification with the Open Pulled Straw (OPS) method. *Veterinari Record* 1999; 144: 180-181;

Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Science* 2000; 60-61: 357-364;

Van der Elst J, Verheyen G. and Van Steirtegehem A. Cryoconservation: Sperms and Oocytes. *Manual on Assisted Reproduction*, Rabe T., Diedrich K., Runnebaum B. (ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1997: 223-251;

Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche V. In vitro survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in an hemi-straw (HS) system. *Fertility and Sterility* 2000; 74, S215-216;

Van Wagendonk-de Leeuw AM, Den Daas JHG. and Rall WF. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: Vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology* 1997; 48: 1071-1084;

Vieira AD, Forell F, Feltrin C, Rodrigues JL. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. *Theriogenology* 2006 in press;

Vincente JS, Garcia-Ximenez F. Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. *Theriogenology* 1994; 42: 1205-1215;

Voelkel SA. and Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1992; 37: 23-37;

Wakayama T. and Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat. Biotechnol.* 1998; 16: 639-641;

Warfield SJ, Seidel GE. Jr and Elsdon RP. Transfer of bovine demi-embryos with and without the zona pellucida. *J. Anim. Sci.* 1987; 65: 756-761;

Watson AJ and Kidder JM. Immunofluorescence assessment of the timing of appearance and cellular distribution of Na/K ATPase during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 1988; 126: 80-90;

Weber PK, Youngs CR. Investigation of cryoprotectant toxicity to porcine embryos. *Theriogenology.* 1994; 41(6):1291-8;

Whittingham DG. Fertilization in vitro and development to term of unfertilised mouse oocytes previously stored at - 196 °C. J. Reprod. Fertil. 1977; 49: 89-94;

Willadsen SM. Factors affecting the survival of sheep embryos during-freezing and thawing. Ciba Found Symp. 1977 Jan 18-20; (52): 175-201;

Wilmot I. The low temperature preservation of mammalian embryos. J. Reprod. Fertil. 1972; 31: 513-514;

Wilmot I. e Rowson LEA. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec. 1973; 92: 686-690;

Womersley C, Uster PS, Rudolph AS. and Crowe JH. Inhibition of dehydration-induced fusion between liposomal membranes by carbohydrates as measured by fluorescence energy transfer. Cryobiology 1986; 23: 245-255;

Wright DL, Eroglu A, Toner M, Toth TL. Use of sugars in cryopreserving human oocytes. Reprod Biomed Online. 2004 Aug; 9(2): 179-86;

Yadav BR, Katiyar PK, Chauhan MS, Madan ML. Chromosome configuration during in vitro maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. Theriogenology 1997; 47: 943-51;

Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y. and Hachinohe Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 1982; Suppl. 32: 399;

Zenzes MT, Bielecki R, Camper RF, Leibo SP. Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertility and Sterility*, 2001; 75: 769-777;

Zachariassen KE. The role of polyols and nucleating agents in cold-hardy beetles. *J. Comp. Physiol.* 1980; 140: 227-234;

Zeron Y, Pearl M, Borochoy A, Arav A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology* 1999 Feb; 38(1): 35-42;

Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*. 2001 Mar; 121(3): 447-54;

Zhang L, Barry DM, Denniston RS, Bunch TD. and Godke RA. Birth of live calves after transfer of frozen-thawed bovine embryos fertilised in vitro. *Vet. Rec.* 1993; 132: 247-249;

Zicarelli L, Di Palo R, Palladino M, Campanile G, Esposito L. Embryo transfer in Mediterranean *bubalus bubalis*. *Proc Int Symp "Prospects of buffalo production in the Mediterranean and the Middle East. Cairo, Egypt, 9-12 nov 1993: 73-75;*

Zicarelli L. Superovulatory response in buffaloes bred in Italy. Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes, Caserta, Italy, 1997: 167-188;

Zicarelli L. Biotecnologie riproduttive nell'allevamento bufalino. Atti 1° Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, 3-5 ottobre 2001, Eboli (SA), Italy: 163-179);

Zicarelli L. Advanced reproductive technologies for improving buffalo production. Proceedings of the 1st Buffalo Symposium of Americas; September 1-8, 2002, Belèm, Parà, Brazil: 186-205.