

**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**  
**XX CICLO**

***“Ottimizzazione delle tecniche di crioconservazione di oociti di bufalo (*Bubalus bubalis*) maturati in vitro mediante strategie innovative di vitrificazione”***

**Tutor:**  
**Chiar.<sup>ma</sup> Prof.<sup>ssa</sup> Bianca Gasparrini**

**Candidata:**  
**Dott.<sup>ssa</sup> Laura Attanasio**

**Coordinatore:**  
**Chiar.<sup>ma</sup> Prof.<sup>ssa</sup> Maria Luisa Cortesi**

**NOVEMBRE 2007**

---

## INDICE

<b>1 INTRODUZIONE</b>	pag. 6
<b>1.1 LE BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLA RIPRODUZIONE</b>	pag. 7
<b>1.2 LA CRIOCONSERVAZIONE</b>	pag. 17
<b>1.2.1 Storia della crioconservazione</b>	pag. 19
<b>1.2.2 Fisica della crioconservazione</b>	pag. 21
<b>1.2.3 Composizione dei media di congelamento</b>	pag. 27
<b>1.2.4 Principali tecniche di crioconservazione</b>	pag. 31
1.2.4.1 IL CONGELAMENTO LENTO	pag. 31
1.2.4.2 IL CONGELAMENTO IN ASSENZA DI EQUILIBRIO O CONGELAMENTO RAPIDO	pag. 36
1.2.4.3 LA VITRIFICAZIONE	pag. 37
<b>1.3 CRIOCONSERVAZIONE DEI TESSUTI RIPRODUTTIVI</b>	pag. 54
<b>1.3.1 Tessuto ovarico</b>	pag. 54
1.3.1.1 COLTURA FOLLICOLARE DOPO CRIOCONSERVAZIONE OVARICA	pag. 56
<b>1.3.2 Tessuto testicolare</b>	pag. 58
<b>1.4 CRIOCONSERVAZIONE DEGLI EMBRIONI</b>	pag. 61
<b>1.4.1 Embrioni bovini</b>	pag. 66
<b>1.4.2 Embrioni ovini e caprini</b>	pag. 70
<b>1.4.3 Embrioni equini</b>	pag. 72
<b>1.4.4 Embrioni suini</b>	pag. 74
<b>1.4.5 Embrioni bufalini</b>	pag. 77
<b>1.4.6 Embrioni micromanipolati</b>	pag. 80
<b>1.5 CRIOCONSERVAZIONE DELLE CELLULE GERMINALI</b>	pag. 84
<b>1.5.1 Gli spermatozoi</b>	pag. 84
<b>1.5.2 Gli oociti</b>	pag. 87
1.5.2.1 CRITERI PER STABILIRE LA QUALITÀ DEGLI OOCITI CRIOCONSERVATI	pag. 92
1.5.2.1.1 <i>Valutazioni non invasive</i>	pag. 92
1.5.2.1.2 <i>Valutazioni invasive</i>	pag. 94
1.5.2.2 CRITERI FUNZIONALI E MOLECOLARI	pag. 102

1.5.2.2.1 <i>Metabolismo ossidativo</i>	pag. 102
1.5.2.2.2 <i>Espressione genica</i>	pag. 103
1.5.2.2.3 <i>Localizzazione e contenuto proteico</i>	pag. 104
1.5.2.2.4 <i>Stabilità genetica</i>	pag. 106
1.5.2.3 STRATEGIE DI MIGLIORAMENTO	pag. 107
1.5.2.3.1 <i>Tecniche di miglioramento: congelamento lento vs vitrificazione</i>	pag. 108
1.5.2.3.2 <i>Inibitori citoscheletrici, stabilizzatori di proteine e di membrana</i>	pag. 118
1.5.2.3.3 <i>Modifica dei costituenti lipidici di membrana</i>	pag. 119
<b>2 PARTE SPERIMENTALE</b>	pag. 122
<b>2.1 PREMESSA E SCOPO DELLA TESI</b>	pag. 123
<b>2.2 ESPERIMENTO 1: <i>Vitrificazione mediante metodi SSV e CLV di oociti di bufalo maturati in vitro</i></b>	pag. 125
<b>2.2.1 Esperimento 1.1: Efficienza della vitrificazione con SSV e CLV</b>	pag. 125
2.2.1.1 PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO	pag. 125
2.2.1.2 MATERIALI E METODI	pag. 126
2.2.1.2.1 <i>Recupero degli oociti</i>	pag. 126
2.2.1.2.2 <i>Maturazione in vitro (IVM)</i>	pag. 127
2.2.1.2.3 <i>Vitrificazione e riscaldamento: metodo SSV</i>	pag. 128
2.2.1.2.4 <i>Vitrificazione e riscaldamento: metodo CLV</i>	pag. 129
2.2.1.2.5 <i>Fecondazione in vitro</i>	pag. 132
2.2.1.2.6 <i>Coltura in vitro (IVC)</i>	pag. 132
2.2.1.2.7 <i>Valutazione dell'efficienza</i>	pag. 133
2.2.1.3 DISEGNO SPERIMENTALE	pag. 134
2.2.1.4 ANALISI STATISTICA	pag. 135
2.2.1.5 RISULTATI	pag. 135
<b>2.2.2 Esperimento 1.2: Effetto di differenti soluzioni vitrificanti sull'efficienza della crioconservazione con il metodo CLV</b>	pag. 140
2.2.2.1 PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO	pag. 140
2.2.2.2 MATERIALI E METODI	pag. 141
2.2.2.2.1 <i>Gruppo CP1</i>	pag. 141
2.2.2.2.2 <i>Gruppo CP2</i>	pag. 142
2.2.2.2.3 <i>Fecondazione in vitro e Coltura in vitro</i>	pag. 143

2.2.2.2.4 <i>Valutazione dell'efficienza</i>	pag. 144
2.2.2.3 DISEGNO SPERIMENTALE	pag. 144
2.2.2.4 ANALISI STATISTICA	pag. 145
2.2.2.5 RISULTATI	pag. 145
<b>2.3 ESPERIMENTO 2: <i>Effetto di differenti concentrazioni di CP nelle soluzioni di vitrificazione e di riscaldamento di oociti vitrificati con il metodo CTV</i></b>	pag. 147
<b>2.3.1 Premessa e scopo del lavoro</b>	pag. 147
<b>2.3.2 Materiali e metodi</b>	pag. 149
2.3.2.1 REAGENTI E MEDIUM	pag. 149
2.3.2.2 RECUPERO DEGLI OOCITI E MATURAZIONE IN VITRO	pag. 150
2.3.2.3 VITRIFICAZIONE E RISCALDAMENTO	pag. 151
2.3.2.4 FECONDAZIONE IN VITRO E COLTURA IN VITRO	pag. 152
2.3.2.5 VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA	pag. 153
<b>2.3.3 Disegno sperimentale</b>	pag. 154
2.3.3.1 GRUPPO 1	pag. 154
2.3.3.2 GRUPPO 2	pag. 155
2.3.3.3 GRUPPO 3	pag. 156
2.3.3.4 GRUPPO 4	pag. 156
<b>2.3.4 Analisi statistica</b>	pag. 157
<b>2.3.5 Risultati</b>	pag. 157
<b>2.4 ESPERIMENTO 3: <i>Miglioramento della fecondazione in vitro di oociti vitrificati mediante CTV</i></b>	pag. 166
<b>2.4.1 Premessa e scopo del lavoro</b>	pag. 166
<b>2.4.2 Materiali e metodi</b>	pag. 168
2.4.2.1 RECUPERO DEGLI OOCITI	pag. 168
2.4.2.2 MATURAZIONE IN VITRO	pag. 168
2.4.2.3 VITRIFICAZIONE	pag. 169
2.4.2.4 RISCALDAMENTO	pag. 170
2.4.2.5 FECONDAZIONE IN VITRO	pag. 170
2.4.2.6 CO-COLTURA DURANTE L'IVF	pag. 171
2.4.2.6.1 <i>Cellule del cumulo in sospensione</i>	pag. 171
2.4.2.6.2 <i>Cellule del cumulo in monostrato</i>	pag. 171
2.4.2.6.3 <i>Co-coltura con COC bovini</i>	pag. 173

2.4.2.7 COLTURA IN VITRO	pag. 173
2.4.2.8 VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA	pag. 175
<b>2.4.3 Disegno sperimentale</b>	pag. 175
<b>2.4.4 Analisi statistica</b>	pag. 176
<b>2.4.5 Risultati</b>	pag. 177
<b>2.5 ESPERIMENTO 4: <i>Studio ultrastrutturale di oociti vitrificati con il metodo CTV</i></b>	pag. 181
<b>2.5.1 Premessa e scopo del lavoro</b>	pag. 181
<b>2.5.2 Materiali e metodi</b>	pag. 182
2.5.2.1 RECUPERO DEGLI OOCITI	pag. 182
2.5.2.2 MATURAZIONE IN VITRO	pag. 182
2.5.2.3 VITRIFICAZIONE E RISCALDAMENTO	pag. 183
2.5.2.4 RISCALDAMENTO	pag. 184
2.5.2.5 FISSAZIONE E TECNICHE DI IMMUNOCITOCHIMICA	pag. 184
2.5.2.6 VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA	pag. 185
<b>2.5.3 Disegno sperimentale</b>	pag. 186
<b>2.5.4 Analisi statistica</b>	pag. 187
<b>2.5.5 Risultati</b>	pag. 187
<b>3 DISCUSSIONE</b>	pag. 190
<b>4 CONCLUSIONI</b>	pag. 214
<b>5 BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 217

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 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. 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) ed 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 limitato da svariati fattori, quali il lungo intervallo generazionale e la produzione di un solo redo per anno; inoltre, la ricombinazione genica, che si verifica al momento della fecondazione, rende impossibile prevedere il valore genetico di un 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. Tuttavia negli ultimi anni l'utilizzo dell'IS ha ottimizzato il contributo paterno al miglioramento genetico che, dunque, ha subito un notevole impulso. L'uso di tale tecnica consente di introdurre genotipi desiderati nell'ambito di una popolazione animale in tempi notevolmente ridotti. Questa tecnica, utilizzata in oltre il 70% della popolazione bovina italiana, sarebbe auspicabile anche

nell'ambito dei programmi di miglioramento genetico della bufala, specie dalle potenzialità produttive notevoli, nonostante lo scarso impegno profuso nei piani di selezione genetica finora perseguita per via materna. Nella bufala, però, alcuni fattori fisiologici, quali l'ampia variabilità della durata delle manifestazioni estrali, l'alta incidenza di calori silenti ed il riscontro di doppie manifestazioni estrali, hanno reso gli interventi di IS difficilmente programmabili, anche quando si ricorre alla sincronizzazione dei calori (Zicarelli L., 2002).

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 esaltandone 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.

La SO consiste nell'induzione di ovulazioni multiple in animali generalmente monovulanti ed il metodo adottato prevede il trattamento degli animali, previamente sottoposti a somministrazione di progestageni, con dosi frazionate di estratti ipofisari di origine ovina o suina, che

promuovono la maturazione e la deiscenza di un numero di follicoli superiore a quello fisiologico. La tappa successiva è rappresentata dal recupero degli embrioni, ottenuti mediante lavaggio delle corna uterine al giorno 6-7 delle femmine donatrici, inseminate in prossimità dell'ovulazione, ed il loro trasferimento in animali riceventi precedentemente sincronizzati. Per ottimizzare i risultati di tale tecnica è necessario utilizzare solo soggetti in 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. and 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, ai fini di accelerare la diffusione di genotipi superiori. 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 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 IVEP. 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 ovaia da macello (29.7 vs 19.9 % di blastocisti 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 (Gasparrini 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.

La crioconservazione delle cellule germinali (spermatozoi ed oociti) e degli embrioni è una tecnologia in forte sviluppo, dato il ruolo fondamentale che riveste per il progresso della ricerca biomedica e per la diffusione in campo delle biotecnologie riproduttive.

Il successo della crioconservazione del seme, almeno nella specie bovina, ha consentito una rapida diffusione della tecnica dell'IS; infatti la possibilità di conservare il seme di animali miglioratori per tempo pressoché illimitato ha dei vantaggi indiscutibili, riassumibili nella facilitata accessibilità al seme e, quindi, in un migliore sfruttamento del materiale genetico maschile, che prescinde dai fattori tempo e localizzazione. Tale tecnologia consente la facilitazione del trasporto e, quindi, del commercio

del seme, con il risparmio dei costi riferibili allo spostamento degli animali e dello stress agli stessi arrecato che, tra l'altro, è noto incidere negativamente sulla sfera riproduttiva. Inoltre la crioconservazione spermatica ha permesso l'uso quotidiano di procedure di IVF per le tecnologie di riproduzione assistita, come l'uso nella riproduzione umana, la preservazione di materiale germinale di specie in via d'estinzione e di animali da laboratorio geneticamente ingegnerizzati. Analogamente, la messa a punto di metodi efficienti per il congelamento embrionale ha contribuito, in misura rilevante, alla diffusione in campo della tecnologia dell'ET nella specie bovina e 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 ET, in modo da ridurre i costi, e la scarsa disponibilità di animali riceventi. Tale problematica assume maggior rilievo nella bufala, specie in cui si registra una minore responsività alla stimolazione ormonale e, quindi, alla sincronizzazione. Si specifica, inoltre, che tale tecnologia è 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; i migliori risultati si ottengono, infatti, nella bufala quando tali interventi

vengono eseguiti nel periodo più favorevole alla sua attività riproduttiva, ovvero nei mesi autunno-invernali.

Laddove notevoli progressi sono stati compiuti nel campo della crioconservazione del seme e degli embrioni, il congelamento degli oociti della maggior parte dei mammiferi rappresenta tuttora una sfida per molti ricercatori, poiché queste cellule sono particolarmente sensibili agli insulti termici. I risultati ottenuti finora in questo campo sono tuttora insoddisfacenti. Attualmente si è registrato un aumentato interesse nei confronti della crioconservazione dei gameti femminili di diverse specie, che ha portato alla messa a punto di svariati metodi.

## 1.2 LA CRIOCONSERVAZIONE

La tecnologia della crioconservazione consente 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 mostrano 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' $\text{LN}_2$  è quella che viene considerata più idonea allo stoccaggio di materiale biologico congelato in quanto studi in questo senso hanno dimostrato che a temperature superiori 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. 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.

Da un punto di vista criobiologico, il congelamento di singole cellule è considerato il più semplice. Un'eccezione è, però, rappresentata dagli spermatozoi e dagli oociti che, pur essendo singole cellule, sono molto sensibili allo stress da freddo. Questo potrebbe essere legato alla loro struttura estremamente specializzata che risponde alla funzione unica di ricostituire un intero organismo dopo la fusione di due singole cellule.

### 1.2.1 Storia della crioconservazione

Più di due secoli fa, nel 1776, Spallanzani è stato il primo autore a riportare il mantenimento della motilità di spermatozoi umani dopo l'esposizione a basse temperature (Van der Elst J. et al., 1997). 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 sui vapori di LN<sub>2</sub>, utilizzando il glicerolo come crioprotettore.

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 °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 °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 in  $\text{LN}_2$  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).

### **1.2.2 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 ed 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  $+15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) che si verifica sia durante la fase di raffreddamento, che durante quella di riscaldamento (Dobrinsky JR., 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, ed 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  $\text{LN}_2$ , 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 ed 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, ed 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 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  $-50^{\circ}\text{C}$ , e poi il trasferimento della stessa in un bagno caldo a  $30^{\circ}\text{C}$  per 1 minuto circa.

### 1.2.3 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 (GE), 1,2-propandiolo, dimetilsolfossido (DMSO), 2,3-butandiolo, glicerolo ed altri alcoli);
- 2) CP non permeabili a basso peso molecolare (galattosio, glucosio, saccarosio, trealosio ed altri zuccheri);
- 3) CP non permeabili ad alto peso molecolare,  $>$  di 50.000 Da (polivinilpirrolidone, polivinil alcool, amido idrossietilico, ialuronato di sodio ed 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/scongelamento 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 ed il glicole propilenico sono stati, fino all'ultimo decennio del secolo scorso, i CP più comunemente usati. L'GE è stato

usato per la prima volta da Miyamoto ed Ishibashi nel 1977; 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 versalità di utilizzo (Bracke e Niemann, 1995). L'efficacia dell'GE 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'GE testandolo a partire da concentrazioni di 1.8 M fino a 8.9 M. Grazie a queste caratteristiche di alta permeabilità e bassa tossicità, ed alle alte percentuali di gravidanza in seguito al suo utilizzo nelle soluzioni di crioconservazione, l'GE 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 GE 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 GE, glicerolo e propandiolo, propandiolo ed GE, in combinazione con saccarosio, trealosio o galattosio (Leibo SP. ed 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 (ZP); la BSA e le anti freezing proteins (AFP, proteine anticongelanti isolate da organismi tolleranti il freddo).

### **1.2.4 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.

#### **1.2.4.1 IL CONGELAMENTO LENTO**

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 rapide.

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 GE, 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  $0.3/1$ °C al minuto;
5. immersione in LN<sub>2</sub> a  $-30/-70$  °C e conservazione a  $-196$  °C;
6. scongelamento controllato con una velocità intorno ai  $250$ °C al minuto (ad es. in acqua a  $25$  °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 ed al seeding, la crescita del ghiaccio nella soluzione extracellulare risulta controllata, di conseguenza si ha un considerevole aumento della concentrazione di ioni, macromolecole ed

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 ed 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 ed il glicerolo, ed 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 ed 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'GE 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.

### 1.2.4.2 IL CONGELAMENTO IN ASSENZA DI EQUILIBRIO O CONGELAMENTO RAPIDO

Il congelamento rapido si riferisce alle procedure di crioconservazione in cui le cellule ed 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 ed 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 LN<sub>2</sub> (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.

### 1.2.4.3 LA VITRIFICAZIONE

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 ed i numerosi ed indiscutibili vantaggi che sono risultati dall'impiego di questa tecnica fino ad ora ne hanno consentito un'ampia diffusione.

Con il termine vitrificazione si intende un processo fisico con il quale una soluzione passa dallo stato liquido a quello vetroso a basse temperature, 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 ed incrementano la viscosità a basse temperature.

Per ottenere la vitrificazione di una soluzione a velocità di congelamento praticabili (con l'immersione diretta in LN<sub>2</sub> 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<sup>7</sup> °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 ZP e/o dell'embrione stesso (Kasai M. et al., 1996; Martino A. et al., 1996) ed 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'GE 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, (ed in questo caso la scelta più ovvia è stata quella dell'GE), e uno o due impermeabili. Componenti addizionali permeabili come glicole propilenico, acetamide, glicerolo, raffinosa e DMSO sono stati testati in varie combinazioni (de la Pena EC. et al., 2001; Kasai M. e Mukaida T.

2004), e quella GE-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 ed i disaccaridi, il saccarosio, il trealosio, il glucosio ed il galattosio sono quelli più utilizzati (Ali J. e Shelton JN 1993; Kasai M. 1997; Wright DL. et al., 2004). Recentemente, così come il GE, il saccarosio è diventato quasi un componente standard nelle soluzioni di vitrificazione. La tossicità di quest'ultimo, così come degli altri zuccheri, può essere ridotta se usato a basse temperature (Rall WF. 1987); infatti, il saccarosio non sembra avere effetto tossico a basse temperature, ed influisce positivamente sulla sopravvivenza embrionale quando applicato per bilanciare il rigonfiamento dopo riscaldamento (Kasai 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 ed 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 GE 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 LN<sub>2</sub>; 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 ZP 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 LN<sub>2</sub> 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 in un bagnetto d'acqua riscaldata a 37 °C, dopo un'esposizione di pochi 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 decrescenti 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., 2003).

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 embrioni od oociti. Queste, però, presentano dei limiti, quali l'impossibilità di usare velocità di raffreddamento/riscaldamento superiori a 2000 °C/min e la necessità di usare un volume cospicuo di soluzione vitrificante per caricare il campione. Fin dai primi esperimenti di vitrificazione era facilmente intuibile che il metodo più semplice per aumentare la velocità di

raffreddamento era sicuramente quello di ridurre il volume della soluzione da vitrificare e cercare di stabilire un contatto diretto tra questa e l' $\text{LN}_2$ .

I primi tentativi, in questo senso, sono stati fatti usando l'approccio più semplice: il gocciolamento del campione direttamente sull' $\text{LN}_2$  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  $\mu\text{l}$ ); inoltre, quando la goccia viene depositata sulla superficie a contatto con l' $\text{LN}_2$  comincia a fluttuare ed a percorrere traiettorie che non sono prevedibili creando, così, una situazione difficile da controllare. Questo fenomeno può essere spiegato dal fatto che l' $\text{LN}_2$  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 ed 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). Successivamente, si è invece imposta la metodica delle Open Pulled Straw (OPS) grazie alla sua facilità di esecuzione ed 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.

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., 2005b), 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. 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 LN<sub>2</sub> (Kuwayama and Kato, 2000; Kuwayama et al., 2005 a; b). 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 LN<sub>2</sub> 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'LN<sub>2</sub>. 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 LN<sub>2</sub> (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 LN<sub>2</sub>, 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'LN<sub>2</sub> 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 ed 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 ed 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' $\text{LN}_2$  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' $\text{LN}_2$  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, sterili, 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 LN<sub>2</sub>, 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 ed operando in LN<sub>2</sub> sterile, in una normale paillette che viene poi sigillata prima dello stoccaggio.

## **1.3 CRIOCONSERVAZIONE DEI TESSUTI RIPRODUTTIVI**

### **1.3.1 Tessuto ovarico**

I progressi nella criobiologia, uniti ai risultati incoraggianti ottenuti con gli animali da laboratorio, hanno spinto la ricerca verso la conservazione del tessuto corticale ovarico; quest'ultimo potrebbe essere reimpiantato nell'individuo ospite, offrendo la possibilità di avere una fertilità normale (Gosden R.G. et al., 1994a). I primi studi di valutazione del tessuto ovarico crioconservato (Deansley, 1956; Parkes, 1956) hanno riportato l'instaurarsi di gravidanze dopo trapianto allogenico di tessuti congelati e scongelati. La capacità degli autotrapianti ovarici di ripristinare la fertilità è stata dimostrata nel topo (Carroll et al., 1993; Guanasena et al., 1997a), nel coniglio (Wiston et al., 1974) e nella pecora (Gosden et al., 1994b). Successivamente l'interesse per questa tecnica è andato aumentando grazie ai successi ottenuti con la sua applicazione negli animali da reddito. Studi recenti hanno dimostrato che il tessuto ovarico crioconservato conserva la sua funzione stereidogenica e la fertilità dopo trapianto allogenico o autologo (Baird et al., 1999; Gosden et al., 1994; Jaszczak et al., 1973). È stato anche osservato un normale sviluppo di follicoli antrali dopo xenotrapianto in topi immunodeficienti di tessuto

ovarico fresco o crioconservato di scimmia (Guanasena et al., 1997b), di pecora (Gosden et al., 1994b), di gatto (Gosden et al., 1994a), di bovino (Semple et al., 2000) e di donna (Stachecki et al., 1998).

I primi tentativi di crioconservazione di tessuti ovarici di topo e ratto hanno utilizzato il glicerolo come CP, ottenendo scarsi risultati (Deanesly, 1954; Parrott, 1960); ciò potrebbe essere attribuito ai danni osmotici o alla bassa permeabilità del glicerolo stesso, come dimostrato da studi successivi su molteplici tipi cellulari (Agca et al., 2002; Gilmore et al., 1997; Paynter et al., 1999). Con la scoperta di CP più efficienti come il DMSO, il GE e l'1,2-propandiolo, il tessuto ovarico di mammiferi è stato crioconservato con successo usando una procedura di congelamento lento, che ha permesso il ripristino del ciclo estrale e dello sviluppo follicolare dopo trapianto in topi immunocompetenti (Agca, 2000). Ovaie di altre specie di mammifero, come uomo, bovino e gatto, presentano dimensioni notevoli e una porzione corticale molto spessa. Questi fattori rappresentano un enorme ostacolo alla corretta diffusione dei CP e del calore; si è per questo impiegata la dissezione per ottenere una giusta crioconservazione di questi tessuti (Oktay et al., 1998).

Le principali limitazioni dei protocolli di crioconservazione ovarica sono rappresentate dall'impossibilità di utilizzare grandi sezioni di tessuto ovarico corticale e dalla rapida morte dei follicoli antrali dopo le procedure di trapianto. Questa rapida degenerazione follicolare è di solito dovuta

alla condizione di scarsa vascolarizzazione e alla necessità del tessuto trapiantato di rivascolarizzarsi (Dissen et al., 1994; Ruffing et al., 1993). Il danno è, in parte, causato dai radicali liberi prodotti quando l'ossigeno torna nuovamente disponibile per i tessuti che ne sono stati privati. Tale danno può essere parzialmente controllato dalla somministrazione di alte dosi di vitamina E (Salle et al., 1998). È stato osservato che alcune molecole, quali sistemi di fattori di crescita endoteliale vasoattivi (VEGF) e gonadotropine (Dissen et al., 1994), possono essere coinvolte nella rivascolarizzazione del tessuto allo trapiantato.

### 1.3.1.1 COLTURA FOLLICOLARE DOPO CRIOCONSERVAZIONE OVARICA

I follicoli primordiali sono le unità più piccole presenti nell'ovaio (circa 50  $\mu\text{m}$ ), e sono costituiti da oociti allo stadio primario, circondati da un singolo strato di cellule della granulosa. A differenza delle cellule germinali maschili, il progresso da follicolo primordiale allo stadio di primario, secondario e terziario si accompagna ad un aumento del diametro (80-120  $\mu\text{m}$ ) e all'accumulo di una maggiore quantità di acqua. Inoltre, gli oogoni presenti al suo interno hanno diverse caratteristiche, quali un basso tasso metabolico, uno stadio del ciclo cellulare stabile, l'assenza della ZP, la mancanza di granuli corticali periferici, un basso numero di lipidi intracitoplasmatici (Jewgenow et al., 1998; Ruffing et al.,

1993) e un ridotto rapporto volume/superficie, che li rendono meno vulnerabili ai danni da freddo rispetto agli oociti maturi. È, quindi, probabile che gli stadi più avanzati delle cellule germinali femminili possano essere seriamente danneggiati durante la crioconservazione d alla formazione di ghiaccio intracellulare, danni subcellulari dovuti al freddo o danni di riperfusione ischemica che si hanno in seguito al trapianto.

Lo sviluppo di un metodo efficiente per conservare, isolare e coltivare follicoli per la maturazione in vitro potrebbe essere un'alternativa alle attuali tecnologie per il mantenimento della fertilità, come il congelamento di embrioni od oociti. Nel topo la maturazione in vitro a lungo termine di oogoni dopo la crioconservazione ha consentito il raggiungimento fino dello stadio di metafase II (Eppig, 1992). In questi esperimenti la crescita e la maturazione sono state ottenute con successo soltanto quando le gonadotropine ricombinanti sono state aggiunte e incubate con una tensione di ossigeno del 20 %; questo sistema ha permesso la crescita di follicoli preantrali precoci dopo la crioconservazione.

In futuro, quindi, la conservazione di tessuto ovarico potrebbe essere impiegata come tecnica per preservare i gameti femminili, ma ancora diverse domande hanno bisogno di trovare risposta prima di poter essere considerata una tecnologia applicabile.

### 1.3.2 Tessuto testicolare

Negli ultimi anni la ricerca si è focalizzata sull'utilizzo del tessuto testicolare crioconservato poiché presenta un numero abbondante di cellule germinali a diversi stadi di sviluppo (Picton et al., 2000).

Gli stadi avanzati delle cellule germinali (spermatidi e spermatozoi) possono essere recuperati con successo dal tessuto testicolare crioconservato (Bahadur et al., 2000; Res et al., 2000) con estrazione meccanica o digestione enzimatica, ed è inoltre possibile raccogliere queste cellule ai primi stadi di sviluppo (spermatogoni) per un'ulteriore maturazione in vivo (Avarbock et al., 1996).

La crioconservazione e il successivo trapianto del tessuto testicolare ha consentito il ripristino della funzionalità endocrina e riproduttiva. Negli ultimi anni sono stati fatti grandi passi avanti con la manipolazione di cellule germinali maschili sia in vivo che in vitro (Honaramooz et al., 2002; Schlatt et al., 2003). I primi esperimenti di trapianto di tessuto testicolare crioconservato sono stati condotti molti anni fa (Parkes et al., 1954), ma solo di recente questa tecnica è entrata a far parte della tecnologia della riproduzione assistita (ART) negli animali (Schlatt et al., 2003).

Nonostante il successo raggiunto con gli spermatozoi estratti da tessuto testicolare maturo congelato-scongelato, l'utilizzo di spermatozoi provenienti da maschi immaturi si è dimostrato di difficile utilizzo.

Le tecniche di crioconservazione e xenotrapianti potrebbero essere usate non solo come mezzo per mantenere e/o consentire lo sviluppo di cellule germinali maschili in un'ampia gamma di mammiferi, ma anche come terapia sostitutiva nell'uomo. Mentre gli spermatozoi maturi sono routinariamente congelati, e prove in corso dimostrano che le cellule germinali maschili immature potrebbero essere prontamente crioconservate se congelate in seguito ad appropriati metodi di isolamento (Avarbock et al., 1996; Crabbe et al., 1999; Ogura et al., 1996), il tessuto testicolare presenta diverse peculiarità da un punto di vista criobiologico. Tra queste ricordiamo: limitazioni nella temperatura e nelle dimensioni della massa trasferita, variazioni del tipo cellulare ,protezione delle interazioni cellula-cellula per il mantenimento dell'integrità funzionale (Karlsson et al., 1996; Paynter et al., 1997). La gonade maschile è un organo riproduttivo altamente compartimentalizzato, dove la spermatogenesi e steroidogenesi avvengono in maniera altamente coordinata e dove esiste una continua proliferazione e differenziazione nei tubuli seminiferi . Poiché ogni compartimento contiene cellule a differenti stadi di sviluppo, con forme e dimensioni diverse, altre complicazioni criobiologiche sorgono in termini di permeabilità e rimozione dei CP, a causa della variazione delle proprietà biofisiche cellulari (conduttività idraulica, permeabilità ai CP) e delle dimensioni del tessuto testicolare raccolto. Altra difficoltà consiste

nell'allontanamento dell'acqua dai tubuli seminiferi che tendono a trattenerla, portando alla formazione di ghiaccio; ciò distruggerebbe la barriera emato-testicolare e/o la struttura dei tubuli stessi, influenzandone la funzionalità post-trapianto. A causa di queste problematiche, gli studi sulla crioconservazione del tessuto testicolare non hanno dato risultati soddisfacenti. Jezek et al. (2001) hanno valutato gli effetti della crioconservazione sulla morfologia del tessuto testicolare di ratto, riportando danni significativi alla struttura dell'epitelio seminifero e in particolare a livello della membrana basale. Questo danno, a livello della lamina propria, ha causato cambiamenti visibili alle cellule del Sertoli, agli spermatogoni e agli spermatociti; inoltre è stata osservata anche la vacuolizzazione degli spermatidi a livello nucleare e citoplasmatico. In uno studio recente di Yin et al. (2003) anche l'utilizzo del congelamento lento in presenza di DMSO ha portato ad una significativa distruzione dei tubuli seminiferi che non mostravano segni di spermatogenesi o steroidogenesi in seguito a xenotrapianti in topi immunodepressi. Questi studi suggeriscono soprattutto che i protocolli attuali non consentono un uso routinario di materiale crioconservato e pertanto ulteriori studi dovrebbero essere condotti.

## 1.4 CRIOCONSERVAZIONE DEGLI EMBRIONI

Le attuali tecniche di congelamento permettono di crioconservare con successo gli embrioni di animali di più specie domestiche per periodi di tempo teoricamente illimitati (DuFrain R.J., 1976).

Esistono molteplici fattori che influenzano la congelabilità degli embrioni; oltre a quelli di cui si è già ampiamente parlato, ossia la velocità di congelamento/scongelo, la tossicità dei crioprotettori ed 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 degli 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 (diversi stadi embrionali); infatti gli stress fisici che queste cellule subiscono durante le procedure di crioconservazione sono tollerati in maniera diversa (Leibo, 1981) ed uno dei fattori che influenza tale comportamento sembra rappresentato dalla flessibilità delle membrane cellulari durante il congelamento. Per gli embrioni 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 ed 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 ed, 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. 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).

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. 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., 2006). 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, ed

analisi più approfondite sul numero totale delle cellule e del nodo embrionale 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 le diverse specie, ed all'interno di ognuna di esse, i diversi stadi di sviluppo embrionale, per meglio comprendere i problemi e le possibili soluzioni che si possono avere nelle procedure di crioconservazione.

### **1.4.1 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 ha causato una profonda disidratazione cellulare ed 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, si riorganizzano più facilmente 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; Sommerfield 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 ed 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 morule compatte (10 %). Inoltre, nello stesso lavoro è stato riportato una maggiore percentuale di sgusciamento 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).

### **1.4.2 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'GE 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 GE come crioprotettore. Cocero et al. (Cocero MJ. 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.

### 1.4.3 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  $\mu\text{M}$ , 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 ZP ed è formato da una glicoproteina simile alla mucina con caratteristiche sovrapponibili a quelle della zona mucillaginosa del coniglio (Oriol JG. et al., 1993). Ciò dimostra che il fattore più critico per la sopravvivenza degli embrioni equini dopo congelamento/scongelo 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 GE ed 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 ed il tradizionale congelamento lento non hanno dato differenze significative nella crioconservazione di blastocisti equine precoci. Più di recente, Caracciolo di Brienza et al. (Caracciolo di Brienza V. et al., 2004) hanno riportato 4 gravidanze dopo il trasferimento di sei embrioni (diametro <300 µm) vitrificati usando 3.4M di glicerolo e 4.6M di GE. 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.

### **1.4.4 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. 2000), la tossicità dei CP (Weber PK et al. 1994), la composizione delle soluzioni di vitrificazione (Berthelot F. et al. 2000; Dobrinsky JR 1996), 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, mentre nessuno sopravviveva nel 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 microtubuli 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 ed 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.

### **4.5 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 ed a due giorni dall'IVF 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 ed alla riespansione della blastocoele, è stata del 65 % (Neglia G. et al., 2001b) 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.

Le innovative tecniche di vitrificazione, che sfruttano volumi minimi di soluzione vitrificante, sono state utilizzate per la prima volta nel 2005 (De Rosa A. et al., 2005), quando embrioni di bufalo prodotti in vitro sono stati vitrificati mediante le OPS, con una combinazione di CP già precedentemente utilizzata da Naitana et al. (Naitana S. et al., 1996) e confrontando i differenti stadi di sviluppo. Dopo 24 h dal riscaldamento, la percentuale di sopravvivenza delle xBI è risultata maggiore rispetto alle morule compatte (MC) e delle hBI (90 vs 47 e 46 % rispettivamente), mentre non ha presentato differenze significative rispetto alle eBI (70%) ed alle blastocisti (69%). La percentuale di sopravvivenza a 48h è stata significativamente maggiore per le xBI rispetto a tutti gli altri stadi (83 % vs 15 %, 51 %, 47 % e 39 % rispettivamente per XBI, TM, eBI, BI e hBI). Nello stesso anno Laowtammathron C. et al. (Laowtammathron C. et al.

nel 2005) hanno utilizzato la metodica Cryotop applicandola unicamente a blastocisti sgusciate, prodotte dopo nuclear transfer, ottenendo una discreta resistenza di queste alla vitrificazione. Nel 2007, De Rosa et al. (De Rosa A. et al., 2007) hanno valutato le percentuali di sopravvivenza dopo 24 h dal riscaldamento di embrioni IVP di bufalo, vitrificati con due differenti combinazioni di crioprotettori già utilizzati precedentemente nella specie ovina (Naitana S. et al., 1996) ed in quella bovina (Vajta et al., 1998). È stato utilizzato il cryotop come strumento di vitrificazione ed è stata osservata l'influenza dello stadio di sviluppo sulla criotolleranza. Tra le due differenti combinazioni non sono state osservate differenze di sopravvivenza (70 % della prima combinazione vs 73 % della seconda). Nonostante ciò elevate percentuali di sopravvivenza sono state osservate per lo stadio di xBI vitrificate con la prima combinazione di crioprotettori

### **4.6 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 ed 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 ZP. 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 ZP. L'integrità di quest'ultima, infatti, risulta fondamentale ai fini della sopravvivenza, come dimostrato dai migliori risultati ottenuti ricorrendo, per il congelamento di semiembrioni, 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-embrioni bovini freschi non hanno evidenziato differenze nelle percentuali di gravidanza rispetto a embrioni senza ZP, embrioni inseriti in una ZP surrogata o inclusi in agar (Warfield SJ. et al., 1987). L'importanza della ZP 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-embrioni 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 ed 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 sessaggio 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 GE 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).

## **1.5 CRIOCONSERVAZIONE DELLE CELLULE GERMINALI**

### **1.5.1 Gli Spermatozoi**

Le pietre miliari per la crioconservazione del seme furono poste più di mezzo secolo fa con le scoperte di agenti protettivi, come il tuorlo d'uovo, per il raffreddamento del seme di toro (Phillips PH. and Lardy HA., 1940) ed, il glicerolo, per il congelamento di seme di pollo (Polge C., 1949) e di toro (Polge C. and Rowson LEA., 1942).

Col passare degli anni sono stati introdotti diversi protocolli di crioconservazione del seme, allo scopo di migliorare l'efficienza del processo e di adattare le procedure anche a specie diverse.

Nonostante i miglioramenti ottenuti, la vitalità post-scongelo e, quindi, la fertilità del seme crioconservato sono ridotte, come conseguenza della sommatoria dei danni cellulari che si verificano durante tutto il processo di crioconservazione.

Il seme dei mammiferi è molto sensibile al raffreddamento dalla temperatura corporea a temperature vicine al punto di congelamento dell'acqua. Lo shock da freddo, infatti, comporta perdita irreversibile della motilità al riscaldamento, perdita della selettività nella permeabilità di membrana, rottura delle membrane acrosomiali ed alterazioni delle

funzioni metaboliche. Da un punto di vista eziologico, i danni riportati sono riconducibili a un riarrangiamento dei costituenti di membrana (Parks JE., 1997).

La composizione specifica della membrana spermatica spiega, quindi, perchè gli effetti del raffreddamento sugli spermatozoi differiscono tra le specie. Il seme di verro è il più sensibile; quello di toro, ariete e stallone è, comunque, molto sensibile; relativamente resistenti sono gli spermatozoi di cane e gatto, mentre quelli di coniglio, uomo e gallo sono più resistenti allo shock da freddo (Parks JE., 1997).

Lo sviluppo dei vari protocolli di crioconservazione degli spermatozoi si è avvalso di sperimentazioni che hanno comparato combinazioni differenti di CP, velocità e condizioni di raffreddamento, congelamento e scongelamento e concentrazione spermatica. Attraverso anni di lavoro sulla crioconservazione spermatica, alcuni protocolli specie-specifici sono stati stabiliti come standards.

Sono state recentemente pubblicate reviews sulla crioconservazione spermatica nelle specie domestiche da reddito, con la descrizione dei protocolli e dei risultati di fertilità per toro (Vishwanath R. and Shannon P., 2000), ariete (Salamon S. and Maxwell WM., 2000), verro (Johnson LA. et al., 2000), becco (Leboeuf B. et al., 2000) e cavallo (Graham JK., 1996), alle quali si rimanda.

L'IS con seme crioconservato è uno strumento di gestione della riproduzione nei bovini da latte, il cui uso si sta espandendo anche ai bovini da carne. Comparato con altre specie, nel bovino un intervento di IS richiede la più bassa dose insemillante con seme crioconservato per ottenere buoni risultati di fertilità, valutati come percentuali di non ritorno. Le ragioni del successo della crioconservazione del seme bovino sono dovute al glicerolo, il quale è stato provato essere un adatto CP per gli spermatozoi bovini (Polge C. and Rowson LEA., 1942), ed all'enorme mole di lavoro svolto sullo sviluppo di protocolli in questa specie durante gli anni settanta (Herman HA. et al., 1994; Vishwanath R. and Shannon P., 2000).

Anche in altre specie si osservano buone percentuali di sopravvivenza spermatica alla crioconservazione con protocolli ideati specificamente, anche se le percentuali di fertilità non sono mai uguali a quelle del seme fresco. Comunque, in alcuni casi il fattore limitante l'uso di seme crioconservato è dato dalle difficoltà di utilizzo della tecnica stessa dell'IS, come negli ovi-caprini (Maxwell WMC. and Watson PF., 1996) e nei bufalini (Neglia G. et al., 2003 b).

Nei cavalli, l'uso di seme crioconservato per l'IS sta aumentando parallelamente alla diminuzione delle restrizioni dei registri di razza (Graham JK., 1996). Comunque la grande variabilità individuale che si osserva tra gli stalloni rappresenta tuttora un problema.

L'estrema sensibilità del seme di verro al congelamento ne sconsiglia al momento l'uso per l'IS (Johnson LA. et al., 2000), che è più spesso effettuata con seme refrigerato.

### **1.5.2 Gli Oociti**

Per un migliore sviluppo delle tecniche di IVF, coltura embrionale e di altre metodologie di micromanipolazione cellulare, si rende necessaria la disponibilità continua di oociti competenti e vitali. Infatti, la breve vita fertile degli oociti di mammifero rappresenta il principale fattore limitante lo sfruttamento del materiale germinale. Questo limite potrebbe essere superato con l'applicazione della crioconservazione, così come avviene correntemente con gli spermatozoi e gli embrioni (Shaw J.M. et al., 2000; Woods E.J. et al., 2004).

Ciò permetterebbe a molte donne che hanno perso la funzionalità delle gonadi, a causa di interventi chirurgici o chemioterapie, di ripristinare l'attività riproduttiva, evitando molti problemi etici e legali, legati alla crioconservazione embrionale.

Le linee germinali femminili di animali domestici o da laboratorio possono essere preservate al fine di ricerche o applicazioni commerciali che vanno

dalle semplici prove di penetrazione spermatica alle tecniche più complicate di clonazione ed ingegneria genetica.

Inoltre la crioconservazione degli oociti rappresenta un importante strumento per la creazione di banche di risorse genetiche negli animali domestici (Ledda S. et al., 2001; Arav A. et al., 2002). Ciò potrebbe facilitare la pianificazione della IVEP ed i conseguenti trasferimenti embrionali.

Gli studi sulla crioconservazione degli oociti risalgono alla fine degli anni '70. Oociti maturi di topo sono stati i primi ad essere crioconservati con successo in una soluzione 1.5 M di DMSO e con una velocità di congelamento lenta e controllata (Whittingham D.G., 1977). Successivamente si sono avute delle nascite dopo il trasferimento di embrioni derivanti da oociti congelati/scongelati di coniglio (Al Hasani S., et al., 1989), bovino (Fuku E. et al., 1992) ed uomo (Chen C., 1986). Comunque l'efficienza è stata bassa, primariamente a causa della riduzione della percentuale di fecondazione dopo il congelamento e lo scongelamento (Niemann H., 1991; Parks J.E. e Ruffing N.A., 1992; Van Blerkom J., 1991). Nel topo, il 50 % degli oociti non si feconda dopo congelamento/scongelamento. Ciò è stato attribuito alle modificazioni a livello della ZP indotte dal congelamento che rendono più difficoltosa la penetrazione da parte dello spermatozoo (Carroll J., 1990); infatti la rimozione (Vanderhyden B.C. et al., 1989) o la foratura (Wood M.J. et al.,

1992) della zona hanno riportato le percentuali di fecondazione a livelli prossimi alla norma.

La maggior parte degli studi sulla crioconservazione degli oociti sono stati condotti nella specie bovina. Nonostante il progresso negli ultimi anni, il limite è rappresentato dalla bassa percentuale di sviluppo degli oociti fino allo stadio di blastocisti (Martino A. et al., 1996). Inoltre solo pochi vitelli sono nati dopo il trasferimento di blastocisti ottenute da oociti congelati o vitrificati (Fuku E. et al., 1992; Hamano S. et al., 1992; Otoi T. et al., 1992; Suzuki T. et al., 1996).

Le ragioni di tutto ciò sono imputabili alle caratteristiche particolari degli oociti. L'oocita di mammifero è una grande cellula, con un diametro che varia da 80 a 120  $\mu\text{m}$  a seconda della specie, circondata da una ZP e da molti strati di cellule della granulosa, che nell'insieme costituiscono il complesso cumulo-oocita (COC). Oociti immaturi allo stadio di vescicola germinale (GV) sono caratterizzati da un grande nucleo diploide (profase I), un denso strato di filamenti di actina disposti al di sotto dell'oolemma, ed organelli come mitocondri, reticolo endoplasmatico, apparato del Golgi, sparsi nell'ooplasma. L'apparato del Golgi dell'oocita dà origine ai granuli corticali, che sono distribuiti casualmente nel citoplasma. L'oocita maturo a livello nucleare (metafase della seconda divisione meiotica, MII) è caratterizzato da un fuso periferico con i microtubuli che si estendono da polo a polo e da ogni polo ai cinetocori dei cromosomi allineati lungo il

piano metafisico. Il fuso meiotico di oociti di mammifero manca dei centrioli ma contiene materiale pericentriolare che serve come centro di organizzazione per la polimerizzazione a ogni polo durante la formazione del fuso (Vincent C. e Johnson MH., 1992). Microfilamenti contenenti abbondante actina sono distribuiti nell'ooplasma perinucleare e corticale, dove dirigono la distribuzione degli organelli e l'estrusione del corpo polare durante la meiosi. Nell'oocita in MII, i granuli corticali migrano alla periferia dell'ooplasma al di sotto della banda di astina, dove essi sono pronti ad andare incontro a esocitosi al momento della fecondazione (Wassarman P.M. et al., 1994).

Molti dei problemi associati con la crioconservazione di oociti maturi ed immaturi sono relativi alla sensibilità alle basse temperature (danni da freddo) ed all'esposizione ai CP (effetti tossici), che comportano considerevoli danni morfologici e funzionali durante la crioconservazione (Zeron Y. et al., 1999; Paynter S.J., 2005). Attualmente, il danno da freddo è uno dei maggiori ostacoli al successo a breve e lungo termine della crioconservazione degli oociti; diversi studi, infatti, hanno suggerito che l'esposizione degli oociti di mammifero a temperature sub-fisiologiche danneggiano la struttura cellulare a vari livelli. Comunque non va trascurato l'effetto tossico dei CP, di solito aggiunti ad alte concentrazioni alle soluzioni di crioconservazione, che, se da una parte evitano la formazione di cristalli di ghiaccio, dall'altra possono alterare l'attività

cellulare in base alla durata ed alla temperatura di esposizione (Chen S.U. et al., 2000). Ricerche eseguite negli anni passati hanno portato allo sviluppo di nuovi approcci per creare un accettabile equilibrio tra gli effetti positivi e negativi dei CP, usando combinazioni più adatte e modificando le velocità di raffreddamento. Sono stati usati nuovi congegni, come macchine automatiche per il raffreddamento, o nuove miscele di CP caratterizzate da una tossicità inferiore e da un'alta capacità di vitrificazione, grazie a cambiamenti di concentrazione, tempi di esposizione e temperature (Vajta G. and Kuwayama M., 2006).

È chiaro che il successo della crioconservazione degli oociti è strettamente legato alla valutazione della qualità degli stessi, sia prima del raffreddamento che dopo il riscaldamento. Sebbene siano stati individuati alcuni criteri di valutazione , “non invasivi” o “invasivi”, allo stato attuale non è ancora possibile valutare oggettivamente lo stato post-riscaldamento degli oociti in maniera appropriata (Coticchio G. et al., 2004; Coticchio G., 2005).

### 1.5.2.1 CRITERI PER STABILIRE LA QUALITÀ DEGLI OOCITI CRIOCONSERVATI

#### *1.5.2.1.1 Valutazioni non invasive*

Il primo criterio usato per stabilire la sopravvivenza post-riscaldamento di oociti degli animali domestici, di solito, consiste in una valutazione morfologica che consente di apprezzare la presenza o assenza di un'ovvia degenerazione o di grosse anomalie citoplasmatiche, come una vasta vacuolizzazione o fratture della ZP. Recentemente, studi sulla crioconservazione di oociti umani hanno portato molti contributi in questo ambito. La visualizzazione del fuso meiotico, attraverso un apparecchio microscopico polarizzato (Polscope; Cambridge Medical Instrumentation, Boston, MA, USA), ha permesso l'osservazione della polimerizzazione del fuso meiotico dopo il riscaldamento. La corretta polimerizzazione del fuso dopo il riscaldamento potrebbe essere usata come un indicatore del potenziale sviluppo degli oociti crioconservati (Rienzi L. et al., 2005). Purtroppo, questo approccio non può essere usato per gli oociti degli animali domestici perché l'alto contenuto di lipidi citoplasmatici, in questi casi, impedisce un'analisi diretta del fuso. I danni alla struttura del citoscheletro dell'ocita in queste specie possono essere osservati solo attraverso metodi invasivi, che presuppongono la fissazione cellulare, come la

microscopia a fluorescenza ed analisi di biologia molecolare o biochimica. La necessità di individuare metodi non invasivi per stabilire fattori di previsione della qualità dell'ocita dovrebbe stimolare la ricerca verso lo sviluppo di nuovi marker di valutazione. Ad esempio, se l'espressione genica delle cellule del cumulo, che circondano gli oociti durante la maturazione, risultasse correlata con le percentuali di sviluppo, essa potrebbe essere usata come marker della qualità dell'ocita prima del congelamento, consentendo, quindi, di selezionare gli oociti più adatti per la crioconservazione (Kumamoto K. et al., 2005). Un altro criterio non invasivo potrebbe essere la determinazione della risposta volumetrica degli oociti maturi a cambiamenti dell'osmolarità prima del congelamento. Misurazioni dinamiche delle risposte volumetriche a concentrazioni crescenti di CP potrebbero permettere una stima precisa del tempo di esposizione e delle concentrazioni ottimali dei CP (Agca Y. et al., 1999; Agca Y. et al., 2000). Ciò aiuterebbe a diminuire gli sfavorevoli effetti osmotici e tossici causati dall'eccessiva concentrazione o dai lunghi tempi di esposizione (Newton H. et al., 1999).

### *1.5.2.1.2 Valutazioni invasive*

Le valutazioni invasive della qualità dell'ocita sono, tuttora, i criteri più frequentemente usati per definire la competenza allo sviluppo di oociti crioconservati negli animali domestici. Queste valutazioni focalizzano la loro attenzione sulle alterazioni morfologiche e funzionali indotte dai procedimenti di crioconservazione.

#### a) Criteri morfologici

È stato osservato che la crioconservazione di oociti di animali domestici comporta danni ultrastrutturali che colpiscono la competenza allo sviluppo e di conseguenza portano a basse percentuali di nascite (Fuku E. et al., 1995; Hyttel P. et al., 2000). Il danno dovuto ai procedimenti di raffreddamento e riscaldamento è stato osservato a diversi livelli ultrastrutturali (Diez C. et al., 2005).

Negli oociti umani e murini sono stati riportati cambiamenti della ZP per il rilascio prematuro di granuli corticali, che potrebbero essere responsabili della diminuzione delle percentuali di fertilizzazione (Ghetler Y. et al., 2006). I granuli corticali sono i mediatori del blocco della polispermia dopo la fertilizzazione. E' stato ipotizzato che il loro prematuro rilascio potrebbe disturbare la tempistica del processo e risultare nell'incremento

delle percentuali di polispermia e conseguente poliploidia (Fuku E. et al., 1995). I cambiamenti della struttura glicoproteica della ZP determinano un indurimento della stessa (Mandelbaum J., 1991), rendendo le penetrazione spermatica più difficoltosa. Inoltre è stata osservata una riduzione dei recettori ZP3 sulla zona, anche se ciò non è risultato associato ad un'alterazione del legame dello spermatozoo alla ZP (Hinsch K.D. et al., 1994), suggerendo un eccesso del numero di tali recettori. Tuttavia, sebbene il numero di spermatozoi che si legano alla ZP non venga ridotto, in oociti esposti a protocolli standard di IVF, dopo la crioconservazione è stata osservata una diminuzione della penetrazione spermatica. L'utilizzo dell'ICSI in questi casi dà la possibilità di superare la barriera di zona e migliorare le percentuali di fecondazione. E' stato riportato che CP come il DMSO ed il saccarosio offrono una migliore protezione della zona rispetto ad altri (Hammitt D.G. et al., 1993).

Altri danni riportati sono rappresentati dalla diminuzione della permeabilità selettiva della membrana plasmatica, dalla perdita di microvilli, dall'estesa disorganizzazione dell'ooplasma e dai cambiamenti nei microtubuli e microfilamenti del fuso (Diez C. et al., 2005). In oociti umani e di topo sono stati descritti anche cambiamenti ultrastrutturali, come l'ingrossamento dei mitocondri, insieme a una ridotta densità della matrice, la disorganizzazione delle giunzioni fra oociti e cellule del cumulo

e la presenza di vacuoli nella periferia dell'ooplasma (Sathananthan A.H. et al., 1987; Valojerdi M.R. e Salehnia M., 2005).

### b) Variazioni delle comunicazioni fra oociti e cellule del cumulo

Le cellule del cumulo circostanti l'oocita giocano un ruolo fondamentale nel processo di maturazione (Gilchrist R.B. et al., 2004; Li G.P. et al., 2006). Queste cellule e l'oocita sono funzionalmente e fisicamente collegate, stabilendo una sofisticata rete di interazioni mutuali, che alla fine conferiscono all'oocita piena competenza allo sviluppo. Ne consegue che la possibilità di crioconservare oociti immaturi dipende dall'abilità di preservare non solo la vitalità dei gameti femminili, ma anche l'integrità strutturale e funzionale dell'intero complesso cumulo-oocita. Sono disponibili poche informazioni sugli effetti della crioconservazione sulle cellule del cumulo, ad eccezione di alcuni studi in cui è stato visto che l'esposizione ai CP risulta nella disorganizzazione dei filamenti di actina, all'interno dei processi transzonalari attraverso cui le cellule del cumulo stabiliscono contatti fisici con l'oocita (Younis A.I. et al., 1996; Diez C. et al., 2005). Comunque rimane ancora irrisolta la questione se sia necessario mantenere le cellule del cumulo durante la crioconservazione degli oociti immaturi, poiché questa necessità potrebbe essere specie-specifica (Modina S. et al., 2004; Fujihira T. et al., 2005;

Ruppero-Lingham C.J. et al., 2006). Questi studi si focalizzavano principalmente sulla vitalità e sulla descrizione dei cambiamenti ultrastrutturali dei complessi cumulo-oocita senza fornire informazioni sul loro accoppiamento funzionale. Sono stati recentemente condotti degli esperimenti nella pecora che hanno analizzato le comunicazioni via gap-junction tra l'oocita e le circostanti cellule del cumulo prima e dopo la vitrificazione, attraverso l'iniezione di un colorante giallo fluorescente Lucifero, che veniva seguito nella sua diffusione alle cellule del cumulo (Bogliolo L. et al., 2007). E' stato così scoperto che il raffreddamento e il riscaldamento riduce significativamente la comunicazione oocita-cellule del cumulo rispetto ad un gruppo di controllo di oociti immaturi. Per valutare meglio come la presenza o l'assenza delle cellule del cumulo potrebbe dare benefici nella sopravvivenza post-riscaldamento e nella maturazione degli oociti immaturi, sono state rimosse le cellule del cumulo a intervalli di tempo differenti (0, 2 e 6 h) durante la maturazione in vitro prima della vitrificazione. E' stata valutata la percentuale di vitalità post-riscaldamento e la progressione meiotica dei complessi cumulo-oocita vitrificati. La rimozione delle cellule del cumulo a 0 h e dopo 2 h di IVM ha significativamente aumentato la vitalità degli oociti vitrificati rispetto agli oociti con cellule del cumulo. Le percentuali di IVM di oociti denudati riscaldati sono state significativamente più alte di quelle degli oociti vitrificati con le cellule del cumulo, sia a 0 che a 2 h di IVM. Quando

le cellule del cumulo sono state rimosse dopo 6 h di IVM, è stata osservata una considerevole riduzione nella vitalità e nella competenza meiotica.

### c) Effetti sull'organizzazione del fuso e del citoscheletro

Molti studi riportano che le condizioni fisico-chimiche durante la crioconservazione potrebbero danneggiare il fuso, causando la perdita irreversibile dei microtubuli (Rho G.J. et al., 2002; Albarracin J.L. et al., 2005; Tharasanit T. et al., 2006). È noto che il fuso dell'ocita in MII negli animali domestici è estremamente sensibile alle basse temperature. Infatti, dopo un convenzionale congelamento lento o vitrificazione, la proporzione di oociti in MII con un fuso morfologicamente normale è ridotta rispetto agli oociti di controllo. Queste alterazioni variano a seconda della specie in questione e delle procedure di crioconservazione (Chen S.U. et al., 2003). L'esposizione di oociti di bovino e di maiale a temperatura ambiente porta a una depolimerizzazione dei microtubuli e alla disgregazione dei fusi meiotici (Aman R.R. e Parks J.F., 1994; Liu R.H. et al., 2003). Analogamente, alterazioni del fuso sono state descritte dopo la vitrificazione di oociti equini in MII (Tharasanit T. et al., 2006). Si è osservato che le alte concentrazioni di CP sono una delle probabili cause dei danni del fuso meiotico (Chen S.U. et al., 2000). Alterazioni del

fuso sono state osservate perfino in oociti crioconservati allo stadio di GV. Infatti in oociti immaturi di pecora vitrificati è stata ottenuta un'alta percentuale di anomalie del fuso dopo IVM. Ciò potrebbe risultare da alterazioni indotte dalla crioconservazione del punto di controllo di assemblaggio del fuso e, conseguente imperfetta segregazione dei cromosomi nel corso della meiosi I durante l'IVM.

### d) Influenza dello stadio meiotico sulla crioconservazione degli oociti

Lo stadio del ciclo cellulare durante la meiosi sembra influenzare la sopravvivenza degli oociti di mammifero dopo la crioconservazione. I primi studi sulla crioconservazione degli oociti sono stati condotti su oociti ovulati e hanno evidenziato una serie di danni ultrastrutturali, quali la disorganizzazione del fuso meiotico (Magistrini M. and Szollosi D., 1980), la depolimerizzazione dei microtubuli con conseguente dispersione dei cromosomi (Sathananthan A.H. et al., 1988), un'aumentata incidenza di aneuploidie e poliploidie al momento della fecondazione (Al Hasani S. et al., 1987; Carroll J. et al. 1989; Glenister P.H. et al., 1987), l'indurimento della ZP ed, in generale, una diminuzione della percentuale di fecondazione (Glenister P.H. et al., 1987; Wood M.J. et al., 1992). Poiché la maggior parte delle alterazioni descritte sono correlate alla specifica configurazione nucleare degli oociti maturi in M II, si è pensato, in un

secondo momento, di congelare oociti immaturi allo stadio di GV in quanto, a questo stadio, il materiale genetico è maggiormente protetto perchè racchiuso all'interno della membrana nucleare. Contrariamente alle aspettative, le percentuali di sopravvivenza riportate per oociti immaturi di bovino (Lim J.M. et al., 1992; Suzuki T. et al., 1996) e suino (Didion B.A. et al., 1990) sono state molto basse. È stato presto evidente che il problema negli oociti immaturi non è rappresentato dal nucleo ma, piuttosto, dal citoplasma. E' stato dimostrato, ad esempio, che la crioconservazione determina la perdita di associazione tra l'oocita e le cellule del cumulo (Cooper A. et al., 1998; Ruppert-Lingham C.J. et al., 2003), la qual cosa interferisce con il processo di maturazione oocitaria a livello citoplasmatico (Gasparrini B. et al., 2003). Quindi, per motivi diversi, l'efficienza della crioconservazione degli oociti, sia maturi che immaturi, nelle diverse specie è molto bassa. Comunque, i roditori rappresentano un'eccezione, come si evince dai buoni risultati ottenuti con gli oociti ovulati di topo e di criceto (Wood MJ. et al., 1993); ciò potrebbe essere attribuito ad una differente sensibilità del citoscheletro di questi oociti al freddo (Vincent C. e Johnson M.H., 1992) o al semplice fatto che gli stessi sono maturati in vivo. Si è dimostrato, infatti, che anche le tecniche di IVM prima della crioconservazione influenzano la successiva fertilizzazione di oociti di topo (Downs S.M. et al., 1986) e di ratto (Vanderhyden B.C. et al., 1989). Lim et al. (Lim J.M. et al., 1992)

hanno dimostrato che lo stadio meiotico in cui si trova l'ocita al momento della vitrificazione influenza lo sviluppo degli oociti bovini raffreddati. Infatti quando gli oociti vengono raffreddati allo stadio di rottura della vescicola germinale (GVBD) essi si dividono e raggiungono lo stadio di blastocisti in percentuali maggiori rispetto a quelli in GV o in MII (Barnes F.L. et al., 1997); inoltre la vitrificazione degli oociti dopo 12 h di maturazione è risultata più efficiente rispetto agli altri tempi considerati (Hochi S. et al., 1997). Nel 2005 Diez et al. (Diez C. et al., 2005) hanno vitrificato oociti bovini immaturi e maturi, riportando percentuali di cleavage e blastocisti più elevate con gli oociti maturi. Rojas et al. (Rojas et al., 2004) hanno vitrificato oociti suini allo stadio di GV e di MII, ottenendo divisione cellulare solo nel gruppo di oociti vitrificati allo stadio di MII. Quindi, attualmente gli oociti in MII restano lo stadio preferenziale per la crioconservazione poiché presentano una migliore stabilità di membrana durante il raffreddamento.

### 1.5.2.2 CRITERI FUNZIONALI E MOLECOLARI

#### *1.5.2.2.1 Metabolismo ossidativi*

I danni a livello di un grande range di strutture cellulari sono stati investigati ampiamente, ma sorprendentemente solo poche informazioni sono disponibili sugli effetti della crioconservazione sui processi biochimici, così come l'inattivazione enzimatica, l'alterazione della concentrazione ionica o i danni da radicali liberi. Questo tipo di informazione giunge da studi sulle cellule somatiche e spermatiche, dove si è osservato che il congelamento ed il raffreddamento alterano l'attività e la stereospecificità dell'azione antiossidante degli enzimi, quali catalasi, glutatione perossidasi e superossido dismutasi, con conseguente riduzione dei loro effetti benefici (Baumber J. et al., 2005; Gadea J. et al., 2005; Lai P.H. et al., 2005). E' stata osservata, in cellule uovo umane crioconservate, la perdita irreversibile della polarità mitocondriale dell'oocita (Jones A. et al., 2004). Questa perdita potrebbe influenzare la competenza allo sviluppo degli oociti con l'alterazione dei livelli di ATP o l'abilità citoplasmatica di regolare il calcio intracellulare. Questi difetti potrebbero avere delle conseguenze a valle su una normale embriogenesi. Le procedure di crioconservazione comportano la formazione dei radicali liberi dell'ossigeno, che possono compromettere

la vitalità e la competenza allo sviluppo. È stato recentemente riportato che l'aggiunta di cisteamina in alte concentrazioni durante l'IVM riduce gli effetti negativi dei radicali liberi e migliora lo sviluppo di embrioni derivanti da oociti bovini crioconservati (Kelly J. et al., 2006). Attualmente la funzione metabolica negli oociti crioconservati resta largamente sconosciuta nonostante il bisogno di un approccio più sistematico che potrebbe dare delucidazioni su ciò che accade durante le procedure di crioconservazione.

### *1.5.2.2 Espressione genica*

Si dispone di una scarsa informazione anche sui cambiamenti indotti dalla crioconservazione a livello molecolare. La conoscenza di questi cambiamenti potrebbe migliorare le procedure e suggerire sistemi ottimali per preservare vitalità e capacità di sviluppo. Analisi accurate dell'espressione genica in risposta alle basse temperature sono state riportate solo nelle cellule spermatiche e somatiche (Fuller B.J., 2003; Meng Q., 2003). In questi studi le informazioni preliminari suggeriscono che i cambiamenti nei geni collegati a importanti funzioni cellulari e nell'espressione genica legata allo stress potrebbero essere usati per meglio definire la qualità degli oociti post-scongelo. I pochi studi che sono stati condotti nel topo, riportano l'esistenza di una correlazione

tra il livello di espressione dei geni legati allo stress, lo stadio embrionale ed i sistemi di crioconservazione utilizzati. Negli zigoti allo stadio di pronuclei è stata evidenziata una sovraespressione dei geni associati allo stress 3 h dopo lo scongelamento rispetto ai controlli, mentre nessuna differenza è stata osservata agli stadi di 8 cellule e blastocisti (Boonkusol D. et al., 2006). È stato anche riportato che l'alterazione dell'espressione genica in oociti di topo maturi, indotta dall'iniezione di mRNA per l'acquaporina-3, che induce un aumento dell'espressione dei canali per acqua e per i CP, migliora la vitalità post-scongelamento (Edashige K. et al., 2003). Sono state infine condotte una serie di analisi in oociti ovini vitrificati in MII per valutare il pattern di espressione genica dopo il riscaldamento. A tale scopo, sono stati scelti geni che in studi precedenti erano risultati correlati con la qualità degli oociti nella pecora (Leoni G.G. et al., 2006). I dati preliminari hanno mostrato che la crioconservazione altera il normale pattern di espressione genica di oociti ovini maturati in vitro e vitrificati.

### *1.5.2.2.3 Localizzazione e contenuto proteico*

Analisi biochimiche e molecolari potrebbero essere usate per stabilire oggettivamente lo stato dell'oocita post-riscaldamento. È ragionevole supporre che la bassa resistenza degli oociti alla

crioconservazione potrebbe essere dovuta ad una deficienza dell'espressione delle proteine coinvolte durante la fecondazione e la divisione. In riferimento a questo, sono stati analizzati i livelli del fattore promotore la maturazione (MPF) e delle proteine chinasiche associate alla mitosi (MAPK), che sono noti giocare un ruolo nella regolazione del ciclo cellulare meiotico e mitotico. In oociti di pecora vitrificati in MII è stato dimostrato che dopo il riscaldamento l'attività delle MAPK non differisce dal gruppo controllo, mentre l'attività del MPF mostra una riduzione transitoria (Succu S. et al., 2006). I livelli più bassi di MPF dopo vitrificazione potrebbero essere correlati alla bassa competenza allo sviluppo; ciò dovrebbe essere considerato nel caso in cui gli oociti crioconservati venissero usati come citoplasti per la tecnica del trapianto nucleare (Hou Y. et al., 2005). Inoltre questa condizione potrebbe spiegare la predisposizione degli oociti vitrificati-riscaldati all'attivazione spontanea. La crioconservazione potrebbe anche cambiare la polarizzazione dell'mRNA e delle proteine nell'oocita. È stato osservato in oociti di topo che l'espressione dell'mRNA per Cdx2 è concentrata in una metà del citoplasma, di solito sul lato opposto al primo corpo polare (Deb K. et al., 2006). Dopo la fecondazione si osserva un riorientamento dell'mRNA per Cdx2, in relazione alla posizione del corpo polare, dal polo vegetativo verso il polo animale, cosicché i trascritti di Cdx2 si concentrano solo su un lato dell'asse che divide i poli animale e

vegetativo. Presumibilmente, questa polarizzazione riflette la riorganizzazione dei componenti citoscheletrici dopo la fecondazione. L'asimmetria nella distribuzione dell'mRNA per Cdx2 osservata negli oociti persiste negli stadi embrionali precoci. Di conseguenza, l'mRNA per Cdx2 e, presumibilmente altri trascritti, associati con i componenti citoscheletrici potrebbero essere distribuiti in modo diseguale tra i 2 blastomeri di uno zigote. Non è possibile escludere che questo riorientamento potrebbe essere fortemente influenzato dalla crioconservazione, a causa delle profonde alterazioni mostrate a livello del citoscheletro.

#### *1.5.2.2.4 Stabilità genetica*

Ci sono ancora pochi studi sulla stabilità genetica cellulare durante la crioconservazione. Alcuni studi suggeriscono che la crioconservazione può provocare danni al DNA nucleare, mitocondriale e ad altre strutture collegate al genoma. Diversi studiosi hanno focalizzato la loro attenzione sugli effetti della crioconservazione sul genoma nucleare (Kola I. et al., 1988; Cobo A. et al., 2001; Men H. et al., 2003). Alterazioni della ploidia sono state trovate negli embrioni umani ed animali ottenuti da oociti crioconservati (Chia C.M. et al., 2000). Al contrario, il problema di una potenziale induzione di mutazioni nel DNA mitocondriale durante la

crioconservazione di oociti di animali domestici è stato alla lunga ignorato. Studi condotti su blastomeri del pesce zebra, semplicemente esposti ai CP o vitrificati, hanno indicato un significativo incremento della frequenza di mutazioni al DNA mitocondriale rispetto ai controlli (Kopeika J. et al., 2005). Diversi fattori possono potenzialmente causare lesioni nel DNA; ad esempio, la produzione eccessiva di radicali liberi dopo la crioconservazione potrebbe essere una delle cause per le mutazioni puntiformi nel DNA mitocondriale. Quest'ultimo è generalmente più sensibile ai radicali liberi rispetto al DNA nucleare. La percentuale di mutazione più alta del DNA mitocondriale può essere attribuita ad almeno due fattori generali: 1) la mancanza di una struttura cromatinica e della protezione istonica e 2) un più limitato repertorio di sistemi enzimatici di riparazione del DNA.

### 1.5.2.3 STRATEGIE DI MIGLIORAMENTO

In tale scenario è opportuno individuare strategie da adoperare per superare i limiti attuali della crioconservazione, come lo scarso sviluppo embrionale. Tali strategie sono basate su due fattori principali: l'utilizzo di CP ottimali ed il ricorso ad elevate velocità di raffreddamento-riscaldamento. Inoltre, partendo dal presupposto che poco si sa sulle

modificazioni fisiologiche causate dalla crioconservazione degli oociti e che nuovi approcci sono necessari per diminuire conseguenti effetti dannosi, sono stati effettuati studi sull'uso di stabilizzatori di proteine, inibitori citoscheletrici e sui cambiamenti nella composizione lipidica di membrana.

### *1.5.2.3.1 Tecniche di miglioramento: congelamento lento vs vitrificazione*

Gli oociti sono molto sensibili al raffreddamento e questo può essere legato a diversi fattori, come la dimensione e la forma della cellula, il ciclo cellulare, la specie e l'origine (*in vitro* ed *in vivo*). Due metodi in particolare sono stati usati per la crioconservazione degli oociti: congelamento convenzionale a basse velocità e la vitrificazione. Il congelamento lento convenzionale rappresenta il primo sistema usato per la crioconservazione di embrioni e questo metodo ed altamente standardizzato grazie ai considerevoli sviluppi industriali e commerciali. In questo sistema le velocità di raffreddamento controllate permettono lo scambio di fluido extracellulare ed intracellulare senza gravi effetti osmotici e cambiamenti della forma della cellula. Inoltre, le soluzioni di CP vengono di solito aggiunte quando la temperatura è piuttosto bassa, con una conseguente diminuzione della tossicità. Questa tecnica è stata

usata con successo per congelare oociti di specie (come topo, gatto) che sono meno sensibili al raffreddamento (Luvoni G.C. et al., 1997; Ruppert-Lingham C.J. et al., 2006) ed è stata largamente usata per congelare oociti ed embrioni umani (Fabbri R. et al., 2001; Byrd W., 2002). Al contrario, scarsi risultati sono stati riportati per specie più sensibili al raffreddamento, come maiale, bovino, pecora e cavallo. Inoltre, importanti limiti all'uso del congelamento lento convenzionale sono dati dal periodo critico di esposizione dell'oocita ai CP e dalla necessità di utilizzare questa tecnica solo in un laboratorio munito di sistemi di congelamento automatizzati.

Le basse percentuali di successo ottenute con l'applicazione di metodi di congelamento lento agli oociti hanno indotto molti autori ad interessarsi alla vitrificazione, quale metodo alternativo per la crioconservazione dei gameti femminili.

Uno dei principali ostacoli alla tecnologia della vitrificazione è rappresentato dalle inadeguate velocità di raffreddamento del metodo convenzionalmente impiegato, che prevede l'immersione diretta in LN<sub>2</sub> di una paillette da inseminazione di 0.25 ml; tale velocità è stata stimata intorno ai 2500°C/minuto.

Nella scorsa decade, molti autori si sono dedicati allo sviluppo di metodi alternativi di raffreddamento-riscaldamento e, più recentemente, si sono create nuove opportunità. La maggioranza delle nuove tecniche proposte

si basa sul contatto diretto tra la soluzione di vitrificazione e l'LN<sub>2</sub>. La maniera più semplice di stabilire questo contatto è l'immersione diretta del campione in LN<sub>2</sub>. Questo approccio, suggerito per la prima volta da Landa e Tepla nel 1990 (Landa V. e Tepla O., 1990) per gli embrioni di topo, è stato poi applicato ad embrioni, zigoti ed oociti bovini (Papis K. Et al., 1999; Riha J. et al., 1991; Yang B.S. e Leibo S.P., 1999). In questo caso, però, il volume della goccia è relativamente grande (5-6 µl) e la velocità di raffreddamento può risultare relativamente bassa, a causa della temporanea fluttuazione del campione sulla superficie dell'LN<sub>2</sub> prima dell'effettiva immersione. Quest'ultimo aspetto potrebbe essere bypassato ricorrendo ad un carrier. Martino et al. (Martino A. et al., 1996), ad esempio, hanno utilizzato come carrier le griglie del microscopio elettronico, dove venivano posti gli oociti bovini prima dell'immersione in LN<sub>2</sub>, riportando una discreta percentuale di sopravvivenza. Con 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 termococonduttività, 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 W.Y. et al., 2005). Nonostante i vantaggi menzionati, gli elevati costi e le difficoltà di esecuzione, hanno impedito la diffusione di questo metodo.

In alternativa all'immersione diretta in azoto, è possibile aumentare la velocità di vitrificazione riducendo il volume del campione. Per ottenere ciò Vajta nel 1998 (Vajta G. et al., 1998) ha applicato il metodo delle OPS a oociti maturi di bovino. Le OPS sono ricavate dalle tradizionali paillette da inseminazione, che vengono riscaldate (sulla fiamma o su una piastra calda) e tirate a mano. L'estremità più sottile viene tagliata con una lama ben affilata. In questo modo 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; ne consegue che il volume della soluzione contenente gli oociti da caricare risulta minore (circa 1 µl vs 5 µl), e la velocità di raffreddamento ottenibile aumenta di almeno dieci volte (20000°C/min), riducendo circa del 30 % la concentrazione ed 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 ed il danno da fratture può essere, grazie ad alcune precauzioni, completamente eliminato. Il caricamento degli oociti 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 oociti, 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 di vitrificazione si trova a diretto contatto con l'LN<sub>2</sub> e lo stoccaggio avviene nello stesso modo delle paillette tradizionali con un unico inconveniente, peraltro facilmente risolvibile, dovuto al galleggiamento delle OPS in LN<sub>2</sub>. 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. Nel 1999 Le Gal e Massip (Le Gal F. e Massip A., 1999) hanno comparato l'efficacia di tre differenti procedure di vitrificazione, quali le paillette, le OPS e le microgocce, su oociti bovini maturi ed immaturi. I risultati hanno mostrato che, dei tre metodi, solo quello delle OPS ha dato blastocisti, indipendentemente dallo stadio meiotico dell'oocita. Successivamente Hurtt et al. (Hurtt A.E. et al., 2000) hanno applicato la tecnica delle OPS ad oociti immaturi e maturi bovini ed equini. La risposta alla vitrificazione degli oociti,

indipendentemente dallo stadio, è risultata migliore nella specie bovina rispetto a quella equina. Nel 2004 Rojas et al. (Rojas et al., 2004) hanno vitrificato oociti maturi di suino con il metodo OPS, ottenendo divisi ma non blastocisti.

Lane et al. hanno riportato risultati soddisfacenti utilizzando il metodo “cryoloop vitrification” (CLV) per la vitrificazione di oociti bovini ed embrioni di criceto e di bovino (Lane M. et al., 1999b). Il cryoloop è uno strumento caratterizzato da un piccolo 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 vengono posti gli oociti, che per il ridottissimo volume, quando immerso in LN<sub>2</sub>, consente di raggiungere velocità di raffreddamento estremamente alte, così come descritto da Isachenko et al. nel 2003 (Isachenko V. et al., 2003). Recentemente il metodo CLV è stato descritto con successo per la vitrificazione di oociti di pecore prepuberi maturati in vitro, ottenendo buone percentuali di cleavage, sebbene la resa in blastocisti sia rimasta bassa (Berlinguer F. et al., 2007; Succu S. et al.; 2007b).

Nel 2000 Dinnyés et al. (Dinnyés A. et al., 2000) hanno vitrificato con successo oociti maturi di bovino, utilizzando la Solid Surface Vitrification (SSV), una nuova metodologia che combina i vantaggi del volume minimo da vitrificare (microgocce), con l'incrementato scambio di calore

di una superficie metallica raffreddata dal contatto con l' $\text{LN}_2$ . In questo caso l'uso di una superficie metallica pulita permetteva il mantenimento della sterilità del campione. In modo specifico, gli oociti di bovino, dopo la maturazione in vitro, venivano posti previamente in una soluzione di equilibrio e poi collocati nella soluzione di vitrificazione. Nell'arco di 20-25 secondi si procedeva, quindi, a formare delle microgocce di soluzione vitrificante contenente 5-10 oociti sulla superficie metallica, ricoperta di carta d'alluminio, di un cubo immerso in  $\text{LN}_2$ . Le gocce, di circa 1-2  $\mu\text{l}$ , in contatto con la superficie, vitrificavano istantaneamente. Le stesse venivano, poi, prelevate con una pinzetta previamente immersa in azoto, e poste in cryovials per la conservazione a lungo termine. Nel 2002 Li et al. (Li X. et al., 2002) hanno comparato il metodo della SSV con quello delle OPS, applicandoli ad oociti maturi di bovino, riportando risultati simili. Begin et al., nel 2003 (Begin I. et al., 2003), hanno utilizzato i metodi SSV e CLV per vitrificare oociti di capra e hanno riportato una migliore efficienza per il CLV. Nel 2006 Somfai et al. (Somfai T. et al., 2006) hanno riportato lo sviluppo a blastocisti in seguito ad attivazione partenogenetica di oociti suini maturati in vitro e vitrificati mediante la SSV.

Matsumoto et al. (Matsumoto H. et al., 2001), successivamente, hanno messo a punto un nuovo metodo, che permette la vitrificazione contemporanea di un gran numero di oociti, la qual cosa non risulta,

invece, possibile con i metodi delle OPS e CLV. Questi autori hanno utilizzato, nella specie bovina, una rete di nylon di forma triangolare, sulla quale posizionare numerosi oociti per immergerli in LN<sub>2</sub>.

Il metodo Cryotop è probabilmente l'ultimo approccio di vitrificazione con metodi di volumi minimi (Kuwayama M. e Kato O., 2000; Kuwayama M. et al., 2005a, 2005b). Tale strumento è rappresentato da una sottile linguetta (0.4 mm larga, 20 mm lunga e 0.1 mm spessa) di polipropilene legata ad un manico di plastica dura, fornito di un cappuccio protettivo della lunghezza di 3 cm per la conservazione del campione vitrificato in LN<sub>2</sub>. Con questo metodo, gli oociti sono posti sulla linguetta, dopodiché la soluzione viene quasi interamente rimossa mediante aspirazione ed 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. La vitrificazione con il Cryotop è stata con successo utilizzata per la crioconservazione di oociti equini maturi e immaturi (Bogliolo L. et al., 2006), oociti bovini (Chian R.C. et al., 2004; Kelly J. et al., 2006), oociti ovini (Kelly J. et al., 2006; Succu S. et al., 2007a) ed oociti porcini (Fujihira T et al., 2005). Solo recentemente sono stati effettuati studi sullo sviluppo di metodi per la crioconservazione di oociti di bufalo. I primi esperimenti sono stati riportati nel 2000 da Dhali et al. (Dhali A. et al., 2000), che hanno applicato la classica metodica di vitrificazione in paillette, ad oociti di bufalo immaturi, allo stadio di

vescicola germinale, utilizzando una complessa miscela di CP. In questa esperienza il 98.4 % degli oociti vitrificati, ha conservato una normale morfologia dopo il riscaldamento, ma solo il 31.5 % ha raggiunto lo stadio di MII dopo la maturazione in vitro.

Nel 2004 Wani et al. (Wani N.A. et al., 2004) hanno riportato per la prima volta dati sullo sviluppo post-fertilizzazione di oociti immaturi di bufalo, vitrificati con il classico metodo delle paillette, ottenendo blastocisti. In questa prova sperimentale gli autori hanno comparato l'efficacia di differenti concentrazioni (3.5, 4, 5, 6 e 7 M) di diversi CP (DMSO, GE, 1,2-propandiolo e glicerolo). Una minore percentuale di oociti morfologicamente normali al riscaldamento ed una minore percentuale di oociti in M II dopo la IVM si è osservata alle concentrazioni 3.5 e 4 M di DMSO, GE e 1,2-propandiolo rispetto alle concentrazioni più elevate (5, 6 e 7 M). A tutte le concentrazioni testate, il glicerolo ha dato i peggiori risultati, con un minore numero di oociti morfologicamente normali ed una minore proporzione di oociti che completavano la maturazione nucleare. La migliore efficienza per le percentuali di cleavage si riscontrava con la concentrazione 7 M di DMSO, GE, 1,2-propandiolo e glicerolo rispetto alle concentrazioni inferiori. Sono state ottenute blastocisti, sebbene con un'efficienza molto bassa, e non sono emerse differenze significative nella percentuale di blastocisti tra nessuno dei protocolli considerati.

Nel 2007 Boonkusol et al. (Boonkusol D. et al., 2007) hanno vitrificato oociti di bufalo Swamp maturati in vitro, confrontando due differenti metodiche, la SSV e le classiche paillette. Sono state valutate le percentuali di sopravvivenza, di cleavage e di blastocisti dopo attivazione partenogenetica, e tutte sono risultate superiori per il metodo SSV rispetto alle paillette. Sempre nel 2007 è stato condotto uno studio (Taru Sharma G. e Loganathasamy K., 2007) sull'effetto dello stadio meiotico durante la maturazione in vitro sulla sopravvivenza di oociti di bufalo vitrificati a differente stadio di IVM, utilizzando le French staw. Oociti maturati per 24 ore prima di essere sottoposti a vitrificazione hanno presentato maggiore tolleranza alle basse temperature, come dimostrato dalle più elevate percentuali di sopravvivenza e di mantenimento dello stato di maturazione post-riscaldamento.

Muenthaisong et al. nel 2007 (Muenthaisong S. et al., 2007) hanno vitrificato oociti di bufalo Swamp maturati in vitro mediante il metodo Cryotop e hanno valutato le percentuali di sopravvivenza post-riscaldamento, di cleavage e di sviluppo a blastocisti dopo attivazione partenogenetica.

#### *1.5.2.3.2 Inibitori citoscheletrici, stabilizzatori di proteine e di membrana*

Un possibile modo per migliorare la tolleranza alla crioconservazione di oociti maturi ed immaturi è la stabilizzazione del citoscheletro con l'uso di citocalasina B (CB). Negli oociti in MII, la CB riduce i danni ai microtubuli ed aumenta la stabilizzazione dei microtubuli del fuso durante la vitrificazione (Rho J.G. et al., 2002). Negli oociti in GV non è presente un fuso meiotico organizzato e l'effetto della CB potrebbe essere quello di preservare la funzione delle gap-junction fra l'oocita e le cellule della granulosa e permettere una penetrazione più veloce ed uniforme dei CP (Vieira A.D. et al., 2002).

Ci sono altri fattori che possono ridurre i danni strutturali: l'aggiunta di taxolo, ad esempio, ha migliorato enormemente lo sviluppo post-raffreddamento di oociti di topo e di bovino vitrificati (Park M.S. et al., 2001; Fuchinoue K. et al., 2004), mentre non ha influenzato la competenza allo sviluppo degli oociti di suino vitrificati (Fujihira T. et al., 2005). Inoltre, è stato proposto di sfruttare le proprietà del trealosio nella protezione di membrana e proteine per dare benefici alla cellula e per migliorare la tolleranza al freddo; è stato quindi osservato che la microiniezione di trealosio in oociti umani ha migliorato significativamente la crioconservazione (Eroglu A. et al., 2002; 2003). La diminuzione

dell'MPF è stato descritto come danno da crioconservazione. Ciò può causare un aumento dell'attivazione partenogenetica e della velocità di frammentazione (Succu S. et al., 2007a; Tian S-J et al., 2007). Teoricamente, la stabilizzazione di queste molecole potrebbe evitare effetti negativi. È stato riportato che molecole come la caffeina potrebbero ristabilire l'attività dell'MPF negli oociti di suino ed ovino riducendo la fosforilazione p34 (cdc2) (Kikuchi K. et al., 2002; Lee J.H. and Campbell K.H., 2006). Su queste basi, è stato analizzato il livello di MPF e la morfologia del fuso di oociti di ovino vitrificati che erano stati incubati in presenza di caffeina per le ultime 2 h di IVM e durante il procedimento di crioconservazione. Dopo il riscaldamento, gli oociti di ovino hanno mostrato un significativo aumento dell'attività di MPF ed una configurazione normale del fuso rispetto al controllo (Succu S. et al., 2006).

### *1.5.2.3.3 Modifica dei costituenti lipidici di membrana*

Negli ultimi anni, strategie alternative sono state proposte per incrementare la sopravvivenza e la competenza allo sviluppo. Due di questi approcci includono la modificazione del contenuto lipidico della membrana citoplasmatica con l'aggiunta di lipidi, quali il colesterolo o la fosfatidilcolina, durante la refrigerazione e gli step di raffreddamento

(Zeron Y. et al., 2002a e 2002b; Horvath G. and Seidel G.E., 2006), e la rimozione dei lipidi citoplasmatici in eccesso con la micromanipolazione, per evitare il loro negativo effetto durante le procedure di raffreddamento (Nagashima H. et al., 1994; Hara K. et al., 2005).

Diversi gruppi hanno tentato di cambiare la composizione della membrana plasmatica durante la procedura in vitro per migliorare la crioconservazione di embrioni e gameti (Hochi S. et al., 1999; Arav A. et al., 2000; Zeron Y. et al., 2002a; Seidel G., 2006). È stato osservato che l'associazione spontanea delle cellule con liposomi contenenti colesterolo, lecitina o sfingomieline non migliora la sopravvivenza al freddo (Pugh P.A. et al., 1998). Una riduzione della sensibilità al raffreddamento è stata ottenuta attraverso la modifica della temperatura di transizione della fase lipidica, in seguito al trasferimento di fosfatidilcolina o dipalmitoilfosfatidilcolina ad oociti maturi (Zeron Y. et al., 2002a). In altri studi, l'aggiunta di albumina-acido linoleico ai media di coltura ha migliorato la sopravvivenza di morule e di oociti enucleati (Hochi S. et al., 1999; 2000). Inoltre, la sopravvivenza di oociti e le percentuali di cleavage potrebbero essere migliorate tramite l'incubazione prima della vitrificazione con ciclodestrina come carrier per il colesterolo (Horvath G. and Seidel G.E., 2006). Comunque, tutti questi studi hanno mostrato che, nonostante significativi miglioramenti osservati nella vitalità degli oociti post-raffreddamento e nel cleavage dopo la modificazione

della composizione lipidica di membrana, le percentuali di blastocisti sono rimaste comparabili a quelle di oociti crioconservati non-modificati.

## **2 PARTE SPERIMENTALE**

## 2.1 PREMESSA E SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni si è osservato un incrementato interesse nella crioconservazione degli oociti di bufalo poiché una limitazione fondamentale della tecnologia di produzione embrionale in vitro (IVEP) in questa specie è rappresentata dal basso numero di oociti recuperabili (Gasparrini B., 2002). La bassa percentuale di recupero è il maggiore fattore limitante la diffusione delle tecnologie IVEP in campo, rendendo il rapporto costi/benefici sfavorevole. D'altra parte questo fattore ostacola severamente il progresso scientifico, perché anche quando si utilizza, a scopo di ricerca, un pool di oociti derivanti da animali da macello, i numeri sono spesso così piccoli da impedire di progettare correttamente gli esperimenti. Inoltre potrebbe anche accadere che solo pochi bufali sono macellati nello stesso giorno e, per ragioni di costi, questa risorsa di materiale sperimentale è spesso persa. Da ciò risulta che la crioconservazione degli oociti di bufalo potrebbe aumentare la disponibilità degli stessi sia per scopi di ricerca che per un futuro uso commerciale.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di verificare la possibilità di crioconservare oociti di bufalo maturati in vitro, mediante differenti metodiche di vitrificazione, aventi come denominatore comune

l'utilizzo di volumi minimi di soluzione vitrificante, che consente di ottenere alte velocità di raffreddamento e riscaldamento, e l'assenza di contenitori, che si traduce nell'incremento degli scambi termici. In particolare, lo scopo della ricerca è stato quello di valutare:

- 1) l'efficienza della Solid Surface Vitrification (SSV) e della Cryoloop Vitrification (CLV) per crioconservare oociti maturi, vitrificati in presenza ed assenza delle cellule del cumulo;
- 2) l'efficienza del metodo della Cryotop Vitrification (CTV), testando diverse concentrazioni di crioprotettori (CP) nelle fasi di vitrificazione e di riscaldamento;
- 3) l'influenza di un supporto di cellule somatiche fornito, durante la fecondazione in vitro, agli oociti vitrificati in assenza delle proprie cellule del cumulo;
- 4) alcuni danni ultrastrutturali, in uno studio preliminare finalizzato ad analizzare lo stato nucleare e quello del fuso meiotico di oociti vitrificati mediante CTV e riscaldati.

## **2.2. ESPERIMENTO 1: *Vitrificazione mediante metodi SSV e CLV di oociti di bufalo maturati in vitro***

Questo primo esperimento è stato suddiviso in due parti.

### **2.2.1 Esperimento 1.1: Efficienza della vitrificazione con SSV e CLV**

#### **2.2.1.1 PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO**

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di comparare le percentuali di sopravvivenza degli oociti post-riscaldamento e quelle di divisione e sviluppo a blastocisti in seguito a fecondazione in vitro (IVF) di oociti vitrificati-riscaldati utilizzando i metodi SSV e CLV, così come precedentemente utilizzati in altre specie (Dinnyes A. et al., 2000; Lane M. et al., 1999b).

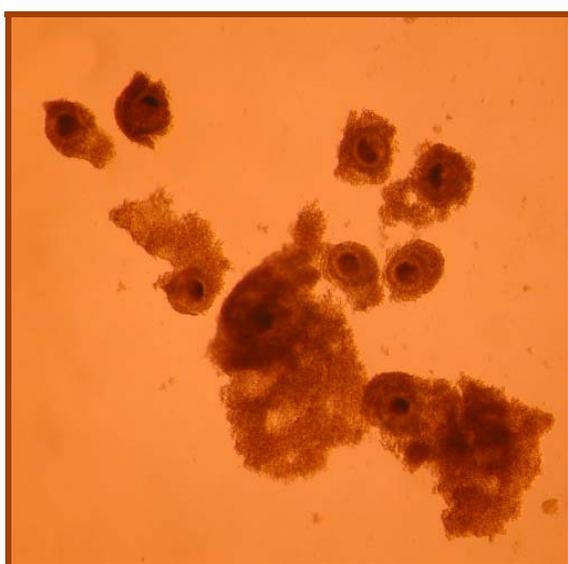
Inoltre, date le differenze specie-specifiche riportate in letteratura (Gook et al., 1993; Miyake et al., 1993), si è ritenuto fondamentale valutare l'effetto della presenza vs assenza delle cellule del cumulo sull'efficienza della vitrificazione, aspetto non ancora analizzato in questa specie.

## 2.2.1.2 MATERIALI E METODI

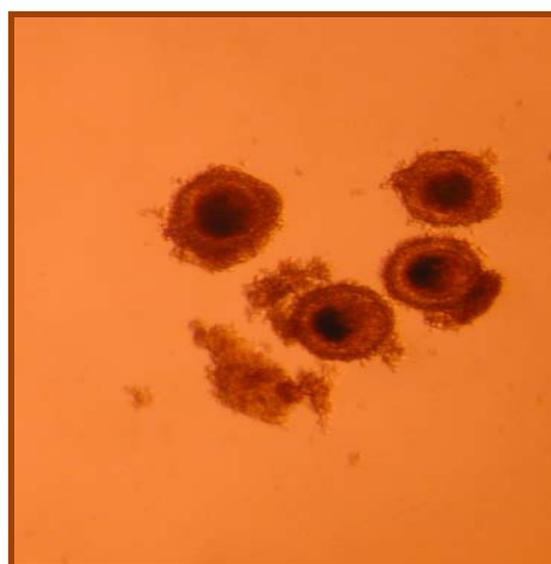
Tutti i reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Sigma (Milano, Italia), se non diversamente specificato.

### 2.2.1.2.1 *Recupero degli oociti*

Le ovaia di bufala sono state prelevate al macello in soluzione fisiologica antibiotata con 150 mg/L di kanamicina a 30-35°C e trasportate in laboratorio entro 3-4 ore dall' avvenuta macellazione. 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).



**Figura 1:** Oociti immaturi di bufalo di grado A



**Figura 2:** Oociti immaturi di bufalo di grado B

Si è proceduto, quindi, con la valutazione morfologica dei COC così raccolti e loro selezione: solo quelli di grado A e B (Neglia et al., 2003), caratterizzati da cumulo compatto e non atresico e citoplasma omogeneo, sono stati utilizzati per la fase sperimentale (Figura 1 e 2).

#### *2.2.1.2.2 Maturazione in vitro (IVM)*

Per la IVM 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 lavati in TCM 199, tamponato con 15 mM di HEPES e 5 mM di bicarbonato di sodio (H199) ed addizionato del 10 % di FCS, e posti in gocce di 50 µl (10 COC/goccia), coperte di olio minerale, del terreno finale di maturazione. 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.

### 2.2.1.2.3 Vittrificazione e riscaldamento: metodo SSV

Gli oociti maturi, previamente denudati delle cellule del cumulo (se non diversamente specificato) mediante gentile spipettamento in H199 con il 10% di FCS e lavati abbondantemente con passaggi seriali nello stesso medium, sono stati posti in una soluzione di equilibrio (SV1), costituita dal 4 % di glicole etilenico (GE) in un terreno base (TB), quale l'H199 addizionato del 20 % di FCS, per 12-15 minuti a 37 °C.

Al termine della fase di equilibrio, gruppi di circa 5 oociti sono stati rapidamente lavati per tre volte in piccole gocce della soluzione di vittrificazione (SV2), costituita dal 35 % di GE, dal 5 % di polivinilpirrolidone e da 0.4 M di trealosio in TB, per 25-30 secondi, e sono stati lasciati cadere su una superficie di un cubo di acciaio, ricoperto da carta d'alluminio e raffreddato ad una temperatura compresa tra -150°C e -180°C mediante parziale immersione in azoto liquido (LN<sub>2</sub>).

Le gocce, di dimensioni variabili tra 1 e 2 µl, vittrificavano istantaneamente al contatto con la superficie metallica (Figura 3).

Le gocce vittrificate sono state riscaldate immediatamente in una soluzione di trealosio 0.3 M a 37 °C per 3 minuti. Gli oociti recuperati sono stati poi lavati in TB e trasferiti in gocce di medium di maturazione, dove sono stati lasciati riposare per circa 1.5 ore prima di effettuare la IVF.



**Figura 3:** Strumentazione per il metodo Solid Surface Vitrification

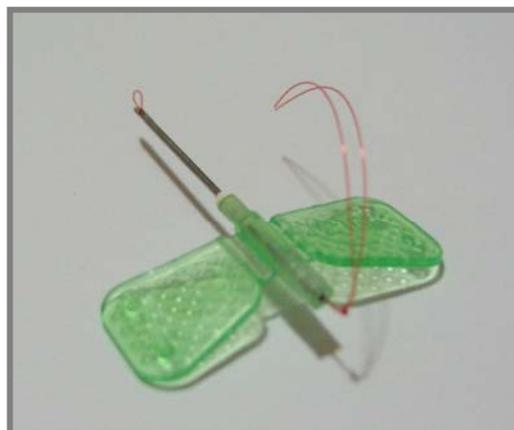
Un gruppo rappresentativo di oociti è stato utilizzato per effettuare il test di tossicità, cioè l'esposizione degli stessi alla SV1 per 12-15 minuti ed alla SV2 per 20-25 secondi, per poi procedere direttamente con la fase di riscaldamento, bypassando l'immersione in LN<sub>2</sub>.

#### *2.2.1.2.4 Vitrificazione e riscaldamento: metodo CLV*

In questo studio i cryoloop (Figura 4) sono stati preparati manualmente utilizzando degli aghi microperfusori di 21 G, il cui

deflussore è stato tagliato, nei quali è stata fatta passare una lenza di 0.16 mm, formante un piccolo cappio all'estremità dell'ago.

Gli oociti 22 h dopo la IVM sono stati lavati e denudati, se non diversamente specificato, in H199 addizionato del 20 % di FCS (TB) e trasferiti in una goccia di circa 200  $\mu$ l

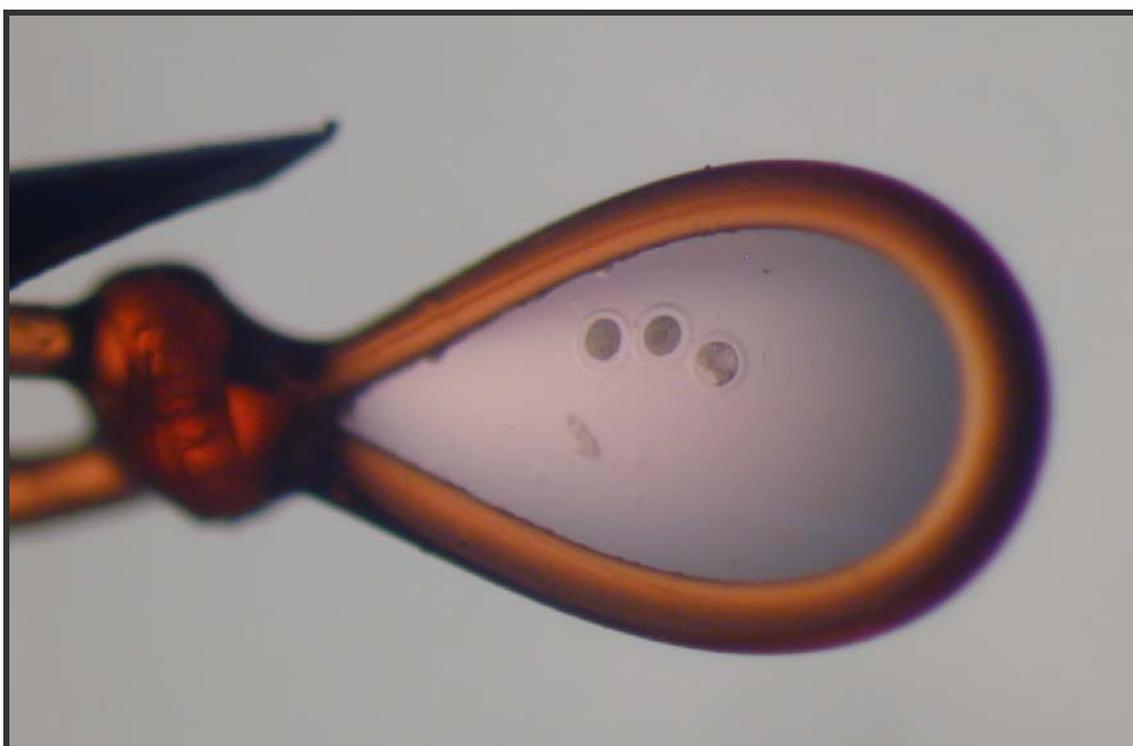


**Figura 4:** Cryoloop.

di una soluzione costituita dal 7.5 % di GE e 7.5 % di dimetilsulfossido (DMSO) nel TB (SV1), per 3 minuti a temperatura ambiente. Successivamente gruppi di 3-6 oociti sono stati trasferiti, con il minor volume possibile, in una soluzione di vitrificazione, costituita dal 16.5 % di GE, 16.5 % di DMSO e 0.5 M di saccarosio nel TB (SV2), per 20-25 secondi. Avvalendosi di una pipetta a bocca tirata alla fiamma, gli oociti sono stati posti sul film di SV2 formato a livello del cappio di nylon (Figura 5). Il cryoloop così caricato è stato poi immerso direttamente in LN<sub>2</sub>. Per il riscaldamento il cryoloop è stato prelevato dall'LN<sub>2</sub> ed il cappio contenente gli oociti è stato immediatamente immerso in una soluzione contenente 1.25 M di saccarosio disciolto nel TB per 1 minuto. Gli oociti recuperati sono stati trasferiti, mediante passaggi seriali di 30 secondi ognuno, in gocce di soluzioni decrescenti di saccarosio (0.625 M, 0.42 M

e 0.31 M). Gli oociti sono stati infine lavati in H199 con 10 % di FCS e rimessi nel medium di maturazione per 1.5 ore prima della IVF.

Anche in questo caso un gruppo rappresentativo di oociti è stato utilizzato per effettuare il test di tossicità, che consisteva nell'esporre gli stessi alla SV1 per 3 minuti ed alla SV2 per 20-25 secondi, per poi procedere direttamente con la fase di riscaldamento, bypassando l'immersione in LN<sub>2</sub>.



**Figura 5:** Oociti posti sul film di SV2, formato a livello del cappio di nylon

#### 2.2.1.2.5. Fecondazione *in vitro*

Gli spermatozoi da utilizzare per la IVF sono stati ottenuti da seme congelato/scongelato di un toro precedentemente testato per l'IVEP. Il seme è stato trattato mediante la procedura dello swim-up per 1 ora, utilizzando il medium Hams. Il pellet ottenuto dopo centrifugazione del surnatante è stato risospeso in modo da raggiungere una concentrazione finale di  $2 \times 10^6$ /ml nel terreno di fecondazione, costituito dal medium Tyrode's 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. L'inseminazione è stata effettuata in gocce di 50  $\mu$ l sotto olio (5 oociti/goccia) a 38.5°C, in presenza del 5 % di CO<sub>2</sub> in aria per una durata di 20-22 ore.

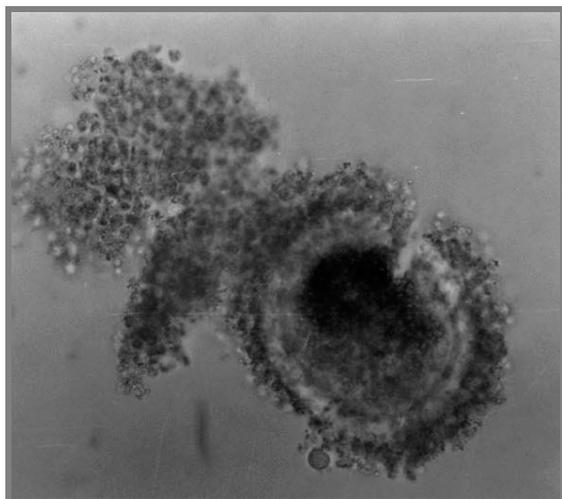
#### 2.2.1.2.6 Coltura *in vitro* (IVC)

Circa 20 ore dopo la IVF, i presunti zigoti sono stati rimossi dal medium di fecondazione, denudati delle cellule del cumulo (nei casi in cui non fosse già stato fatto), lavati 2 volte in un medium detto Fluido Sintetico Oviduttale (SOF) tamponato con Hapes e distribuiti in gocce di 20  $\mu$ l 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.

#### 2.2.1.2.7 Valutazione dell'efficienza

La sopravvivenza degli oociti è stata valutata morfologicamente subito prima della IVF (giorno 0). Gli oociti con alterazioni strutturali, quali estrusione o coartazione del citoplasma e rottura della zona pellucida (ZP) e/o membrana plasmatica, sono stati considerati come non sopravvissuti.



**Figura 6:** Rottura della zona pellucida



**Figura 7:** Perdita del materiale citoplasmatico

La valutazione del cleavage, ovvero della percentuale di embrioni divisi a 2 cellule, è stata effettuata al giorno 5 di coltura. Gli oociti indivisi sono stati eliminati e gli embrioni trasferiti in terreno fresco per ulteriori due

giorni. La resa embrionale, intesa come percentuale di blastocisti (BI), è stata valutata al giorno 7.

### 2.2.1.3 DISEGNO SPERIMENTALE

Un totale di 1045 oociti, al termine della IVM, sono stati distribuiti in 10 gruppi sperimentali.

In particolare 61 oociti sono stati vitrificati con il metodo SSV in presenza delle cellule del cumulo, mentre 129 sono stati previamente denudati. Per il metodo CLV 132 oociti sono stati vitrificati in presenza di cellule del cumulo e 155 in assenza. Il test di tossicità ai crioprotettori per il metodo SSV è stato effettuato su 78 oociti circondati da cellule del cumulo e 85 oociti previamente denudati, mentre per il metodo CLV su 102 oociti con cellule del cumulo e 141 denudati. In maniera analoga sono stati previsti due gruppi di controllo: 76 oociti sono stati fecondati regolarmente dopo la IVM, mentre in 86 le cellule del cumulo sono state rimosse prima della IVF. L'esperimento è stato ripetuto 6 volte.

#### 2.2.1.4 ANALISI STATISTICA

I dati dei test di tossicità, inerenti alle percentuali di sopravvivenza, cleavage e blastocisti, sono stati analizzati mediante ANOVA, usando un modello multifattoriale, che includeva l'effetto del trattamento (SSV vs CLV vs controllo), l'effetto cellule del cumulo (presenza vs assenza) e la loro interazione (SPSS 12.0., 2005). Le percentuali di sopravvivenza, cleavage e blastocisti ottenute da oociti sottoposti a vitrificazione sono state analizzate utilizzando lo stesso modello summenzionato, mantenendo gli stessi gruppi di controllo.

Le differenze tra le medie dei gruppi sono state esaminate mediante la differenza minima significativa (L.S.D.;  $\alpha=0.05$ ).

#### 2.2.1.5. RISULTATI

I risultati della vitrificazione sono mostrati in Tabella 1.

Sebbene le percentuali di sopravvivenza siano state elevate in tutti i gruppi, quando gli oociti sono stati vitrificati con il metodo CLV, in assenza di cellule del cumulo, tale valore è risultato significativamente inferiore rispetto agli altri gruppi, ma non diverso da quello osservato per gli oociti vitrificati con il metodo SSV in assenza di cellule del cumulo. La

percentuale di cleavage del Gruppo di controllo, corredato dalle cellule del cumulo, è risultata significativamente più alta rispetto a tutti gli altri gruppi, tranne che rispetto a quella ottenuta dagli oociti vitrificati con il metodo CLV, in assenza delle cellule del cumulo.

E' opportuno sottolineare che la percentuale di cleavage ottenuta dagli oociti non vitrificati è stata significativamente ridotta in assenza vs presenza delle cellule del cumulo. Quando sono stati utilizzati oociti con le cellule del cumulo, la vitrificazione, sia con il metodo CLV che SSV, ha comportato una riduzione significativa della percentuale di divisione rispetto al controllo. Al contrario, quando sono stati utilizzati oociti denudati, entrambi i metodi di vitrificazione hanno dato valori di cleavage simili a quello ottenuto dagli oociti nudi non vitrificati. Comunque, il metodo CLV ha dato una percentuale di cleavage significativamente più elevata rispetto a quello SSV con gli oociti denudati, mentre non sono state trovate differenze tra i due metodi con gli oociti circondati dalle cellule del cumulo. Infatti tale valore è risultato significativamente ridotto quando gli oociti sono stati vitrificati con il metodo CLV in presenza vs assenza delle cellule del cumulo. Al contrario, nessuna differenza si è verificata per il metodo SSV nelle stesse condizioni.

Lo sviluppo a blastocisti è stato significativamente inferiore in tutti i gruppi di vitrificazione rispetto al controllo con le cellule del cumulo, mentre nessuna differenza è stata osservata tra i metodi SSV e CLV. E'

interessante osservare che, nel Gruppo controllo, la percentuale di blastocisti è stata significativamente più alta per gli oociti con le cellule del cumulo rispetto a quelli denudati, mentre tale valore non è risultato influenzato dalla presenza/assenza delle cellule del cumulo in entrambi i gruppi di vitrificazione.

I risultati dei test di tossicità sono riportati in Tabella 2.

Una percentuale di sopravvivenza significativamente più bassa è stata osservata nel Gruppo SSV sia rispetto al Gruppo CLV che rispetto al controllo con gli oociti denudati, mentre nessuna differenza è stata trovata tra i trattamenti con gli oociti provvisti di cellule del cumulo. Comunque, all'interno di ciascun trattamento, non sono emerse differenze statisticamente significative nelle percentuali di sopravvivenza in funzione presenza/assenza delle cellule del cumulo.

Le percentuali di cleavage ottenute dagli oociti esposti alle sole soluzioni, sia in presenza che in assenza delle cellule del cumulo, non sono state significativamente differenti tra i Gruppi SSV e CLV e neanche rispetto ai gruppi di controllo. Comunque, una significativa riduzione delle percentuali di blastocisti è stata osservata in tutti i gruppi rispetto al Gruppo controllo degli oociti con le cellule del cumulo. La presenza del cumulo ha avuto un effetto benefico sia nel controllo che nel Gruppo CLV, mentre è risultata ininfluenza nel Gruppo SSV.

**Tabella 1.** Percentuali di sopravvivenza e di sviluppo embrionale in vitro di oociti di bufalo maturati in vitro in seguito a vitrificazione-riscaldamento con i metodi SSV vs CLV, in presenza o assenza di cellule del cumulo

	<b>COC</b>	<b>% Sopravvivenza</b>	<b>% Cleavage/sopravvissuti</b>	<b>% BI/sopravvissuti</b>
<b>Trattamenti</b>	N.	N. (mean ± SD)	N. (mean ± SD)	N. (mean ± SD)
<i>Controllo</i>				
+ cellule del cumulo	76	76 (100.0 ± 0.0) <sup>a</sup>	47 (61.6 ± 2.4) <sup>a</sup>	20 (27.0 ± 6.8) <sup>a</sup>
- cellule del cumulo	86	86 (100.0 ± 0.0) <sup>a</sup>	30 (34.1 ± 3.3) <sup>bd</sup>	6 (5.8 ± 4.6) <sup>b</sup>
<i>SSV</i>				
+ cellule del cumulo	61	58 (95.8 ± 5.3) <sup>a</sup>	9 (15.2 ± 7.7) <sup>bc</sup>	1 (1.5 ± 2.9) <sup>b</sup>
- cellule del cumulo	129	109 (84.6 ± 16.5) <sup>ab</sup>	26 (25.9 ± 12.7) <sup>b</sup>	6 (7.0 ± 7.1) <sup>b</sup>
<i>CLV</i>				
+ cellule del cumulo	132	130 (98.5 ± 2.3) <sup>a</sup>	18 (14.2 ± 9.1) <sup>c</sup>	0 (0.0 ± 0.0) <sup>b</sup>
- cellule del cumulo	155	126 (81.4 ± 18.4) <sup>b</sup>	55 (45.4 ± 16.6) <sup>ad</sup>	3 (2.8 ± 7.1) <sup>b</sup>

<sup>a, b, c, d.</sup> valori con lettere differenti nella stessa colonna sono significativamente differenti; P<0.05

**Tabella 2.** Percentuali di sopravvivenza e di sviluppo embrionale in vitro di oociti di bufalo maturati in vitro esposti alle soluzioni di vitrificazione-riscaldamento dei metodi SSV vs CLV, in presenza o assenza di cellule del cumulo

	<b>COC</b>	<b>% Sopravvivenza</b>	<b>% Cleavage/sopravvissuti</b>	<b>% BI/sopravvissuti</b>
<b>Trattamenti</b>	N.	N. (mean $\pm$ SD)	N. (mean $\pm$ SD)	N. (mean $\pm$ SD)
<i>Controllo</i>				
+ cellule del cumulo	76	76 (100.0 $\pm$ 0.0) <sup>a</sup>	47 (61.6 $\pm$ 2.4) <sup>a</sup>	20 (27.0 $\pm$ 6.8) <sup>a</sup>
- cellule del cumulo	86	86 (100.0 $\pm$ 0.0) <sup>a</sup>	30 (34.1 $\pm$ 3.3) <sup>b</sup>	6 (5.8 $\pm$ 4.6) <sup>bc</sup>
<i>SSV</i>				
+ cellule del cumulo	78	75 (96.5 $\pm$ 4.2) <sup>ac</sup>	30 (43.8 $\pm$ 20.6) <sup>ab</sup>	6 (9.7 $\pm$ 8.8) <sup>bc</sup>
- cellule del cumulo	85	73 (84.4 $\pm$ 13.2) <sup>bc</sup>	29 (42.4 $\pm$ 15.0) <sup>ab</sup>	5 (6.2 $\pm$ 5.3) <sup>bc</sup>
<i>CLV</i>				
+ cellule del cumulo	102	102 (100.0 $\pm$ 0.0) <sup>a</sup>	54 (53.3 $\pm$ 10.7) <sup>ab</sup>	13 (12.8 $\pm$ 4.4) <sup>b</sup>
- cellule del cumulo	141	139 (98.8 $\pm$ 3.1) <sup>a</sup>	64 (45.6 $\pm$ 13.0) <sup>ab</sup>	2 (1.3 $\pm$ 3.4) <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> valori con lettere differenti nella stessa colonna sono significativamente differenti; P<0.05

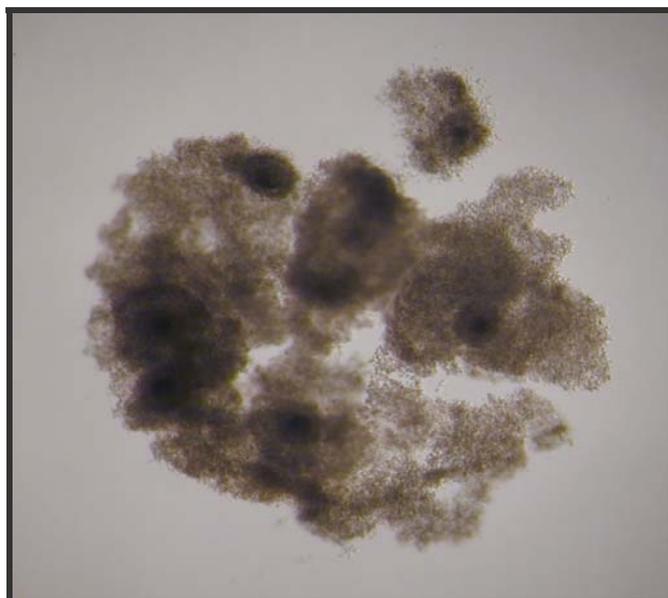
## **2.2.2 Esperimento 1.2: Effetto di differenti soluzioni vetrificanti sull'efficienza della crioconservazione con il metodo CLV**

### **2.2.2.1 PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO**

E' opportuno sottolineare che, anche a causa della scarsità di materiale sperimentale, nell'Esperimento 1.1. le metodiche SSV e CLV sono state confrontate nel loro insieme, ovvero utilizzando le specifiche combinazioni di CP ed i relativi tempi di esposizione descritti in precedenza, per ciascuna metodica, dai rispettivi ideatori (Dinnyés A. et al., 2000; Lane M. et al., 1999). Ne consegue l'impossibilità di stabilire se il miglioramento della percentuale di cleavage, descritto nell'esperimento precedente con il metodo CLV, sia attribuibile allo strumento utilizzato o alle diverse soluzioni impiegate durante la vitrificazione. Pertanto, nell'Esperimento 1.2 si è voluto verificare questo aspetto, valutando l'effetto delle diverse soluzioni di vitrificazione e dei relativi tempi di esposizione prima utilizzati, usando un unico strumento, quello risultato più promettente, ovvero il cryoloop. Inoltre, essendo stato dimostrato un effetto negativo delle cellule del cumulo sull'efficienza di vitrificazione, da questo momento sono stati vitrificati solo oociti denudati.

#### 2.2.2.2. MATERIALI E METODI

Oociti provenienti da ovaia di animali da macello e maturati in vitro (Figura 8) secondo il protocollo precedentemente descritto sono stati suddivisi in due differenti gruppi di vitrificazione/riscaldamento.



**Figura 8:** Oociti maturi di bufalo

##### 2.2.2.2.1 Gruppo CP1

Gli oociti maturi, previamente denudati delle cellule del cumulo mediante spipettamento in H199 con il 10% di FCS e lavati abbondantemente con passaggi seriali nello stesso medium, sono stati posti in una soluzione di equilibrio, costituita dal 4 % di GE in TB, per 12-15 minuti a 37 °C.

Al termine della fase di equilibrio, gruppi di circa 5 oociti sono stati rapidamente lavati per tre volte in piccole gocce della soluzione di vitrificazione, costituita dal 35 % di GE, dal 5 % di polivinilpirrolidone e da 0.4 M di trealosio in TB, per 25-30 secondi. Con l'ausilio di una pipetta a bocca tirata alla fiamma gli oociti sono stati caricati su un film di soluzione di vitrificazione formato a livello del cappio. Il cryoloop è stato quindi immerso in LN<sub>2</sub>. Per il riscaldamento il loop è stato direttamente messo a contatto con una soluzione di trealosio 0.3 M a 37 °C per 3 minuti. Gli oociti recuperati sono stati poi lavati in TB e trasferiti in gocce di medium di maturazione, dove sono stati lasciati riposare per circa 1.5 ore prima di effettuare la IVF.

#### *2.2.2.2 Gruppo CP2*

Gli oociti 22 h dopo la IVM sono stati lavati e denudati in TB e trasferiti in una goccia di circa 200 µl di una soluzione costituita dal 7.5 % di GE e 7.5 % di DMSO nel TB (SV1), per 3 minuti a temperatura ambiente. Successivamente gruppi di 3-6 oociti sono stati trasferiti, con il minor volume possibile, in una soluzione di vitrificazione, costituita dal 16.5 % di GE, 16.5 % di DMSO e 0.5 M di saccarosio nel TB (SV2), per 20-25 secondi. Avvalendosi di una pipetta a bocca tirata alla fiamma, gli oociti sono stati posti sul film di SV2 formato a livello del cappio di nylon.

Il cryoloop così caricato è stato poi immerso direttamente in LN<sub>2</sub>. Per il riscaldamento il cryoloop è stato prelevato dall'LN<sub>2</sub> ed il suo cappio immediatamente immerso in una soluzione contenente 1.25 M di saccarosio disciolto nel terreno base per 1 minuto. Gli oociti recuperati sono stati trasferiti, mediante passaggi seriali di 30 secondi ognuno, in gocce di soluzioni decrescenti di saccarosio (0.625 M, 0.42 M e 0.31 M). Gli oociti sono stati infine lavati in H199 con il 10 % di FCS e rimessi nel medium di maturazione per 1.5 ore prima della IVF.

#### *2.2.2.2.3 Fecondazione e coltura in vitro*

Gli spermatozoi da utilizzare per la IVF sono stati trattati mediante la procedura dello swim-up per 1 ora, utilizzando il medium Hams. Il pellet ottenuto dopo centrifugazione del surnatante è stato risospeso in modo da avere una concentrazione finale di  $2 \times 10^6$ /ml nel terreno di fecondazione. L'inseminazione è stata effettuata in gocce di 50 µl sotto olio (5 oociti/goccia) a 38.5°C, in presenza del 5 % di CO<sub>2</sub> in aria per una durata di 20-22 ore.

Circa 20 ore dopo la IVF, i presunti zigoti sono stati rimossi dal medium di fecondazione 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.

#### *2.2.2.2.4 Valutazione dell'efficienza*

La sopravvivenza degli oociti è stata valutata morfologicamente subito prima della IVF (giorno 0). Gli oociti con alterazioni strutturali, quali estrusione o coartazione del citoplasma e rottura della ZP e/o membrana plasmatici, sono stati considerati come non sopravvissuti.

La valutazione del cleavage, ovvero della percentuale di embrioni divisi a 2 cellule, è stata effettuata al giorno 5 di coltura. Gli oociti indivisi sono stati eliminati e gli embrioni trasferiti in terreno fresco per ulteriori due giorni. La resa embrionale, intesa come percentuale di blastocisti, è stata valutata al giorno 7.

#### 2.2.2.3 DISEGNO SPERIMENTALE

Un totale di 116 oociti, denudati dopo 22 h di IVM, sono stati equamente suddivisi in due gruppi di vitrificazione. Il Gruppo CP1, (N=52), è stato esposto alle soluzioni di vitrificazione/riscaldamento del metodo SSV, mentre il Gruppo CP2 (N=64) a quelle del metodo CLV. Per

entrambi i gruppi sperimentali è stato utilizzato lo strumento cryoloop per la vitrificazione.

L'esperimento è stato ripetuto 3 volte.

#### 2.2.2.4 ANALISI STATISTICA

Le differenze tra i gruppi nelle percentuali di sopravvivenza, cleavage e blastocisti sono state analizzate mediante il test del Chi-quadro.

#### 2.2.2.5 RISULTATI

I risultati dell'Esperimento 2 sono illustrati in Tabella 3.

Non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi per quanto concerne le percentuali di sopravvivenza e di blastocisti. E' stato, invece, osservato un più elevato valore di cleavage ( $P < 0.05$ ), valutato sugli oociti sopravvissuti al riscaldamento, nel Gruppo CP2 rispetto al Gruppo CP1.

**Tabella 3.** Effetti delle diverse soluzioni vitrificanti sulla sopravvivenza e sviluppo successivo post-IVF di oociti vitrificati con il metodo CLV.

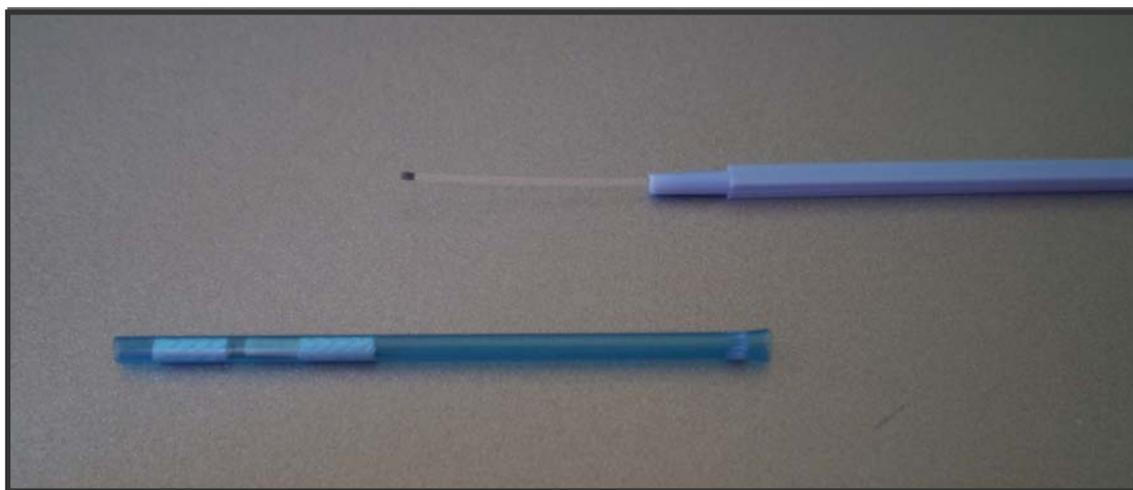
<b>Gruppi</b>	<b>N.</b>	<b>sopravvivenza N. (%)</b>	<b>cl/sopravvissuti N. (%)</b>	<b>BL/sopravvissuti N. (%)</b>
<b>CP1</b>	52	37 (71.1)	8 (21.6) <sup>a</sup>	2 (5.4)
<b>CP2</b>	64	47 (73.4 )	20 (42.5) <sup>b</sup>	1 (2.1)

<sup>a,b</sup> valori con lettere differenti nella stessa colonna sono significativamente differenti; P<0.05

## **2.3 ESPERIMENTO 2: *Effetto di differenti concentrazioni di CP nelle soluzioni di vitrificazione e di riscaldamento di oociti vitrificati con il metodo CTV***

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

La metodica CTV (Kuwayama M. et al., 2005) è quella ideata più di recente utilizzando l'approccio dei volumi minimi di vitrificazione. Questo strumento (Figura 9) 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 per la protezione del campione vitrificato durante lo stoccaggio in LN<sub>2</sub> (Kitazato Sully Co).



**Figura 9:** Strumento Cryotop

Al momento della pianificazione sperimentale l'uso del cryotop per vitrificare oociti di bufalo non era ancora 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 oociti, abbiamo voluto verificare se l'uso del cryotop potesse incrementare l'efficienza della vitrificazione di oociti di bufalo maturati in vitro.

Dai risultati dell'Esperimento 1.1 si è osservato che, se da una parte la presenza di cellule del cumulo in qualche modo protegge gli oociti durante i test di tossicità, evitando la completa penetrazione dei crioprotettori, dall'altra parte impedisce la corretta protezione degli oociti stessi durante la vitrificazione. Si è quindi voluto utilizzare solo oociti denudati per i vari gruppi di vitrificazione, pur mantenendo come Gruppo di controllo quello con le cellule del cumulo, in quanto indice dell'efficienza del sistema IVEP per ciascuna replica. Inoltre nell'Esperimento 1.2 l'utilizzo di GE e DMSO come crioprotettori nelle soluzioni di vitrificazione e di saccarosio in quelle di riscaldamento ha aumentato l'efficienza della metodica CLV. Lo scopo di questo esperimento è stato quello di verificare l'efficacia del CTV sugli oociti maturi di bufalo, testando sia differenti concentrazioni di GE e DMSO

nelle soluzioni di vitrificazione che differenti concentrazioni di saccarosio in quelle di riscaldamento.

## **2.3.2 Materiali e Metodi**

### **2.3.2.1 REAGENTI E MEDIUM**

A meno che non sia altrimenti specificato tutti i reagenti sono stati forniti dalla Sigma (Milano, Italia).

Il medium di IVM (B199) consisteva in TCM199 tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio, a cui era stato aggiunto il 10 % di FCS, 0.2 mM di piruvato, 0.5 µg/ml FSH, 5 µg/ml LH, 1 mg/ml 17β-estradiolo, 50 µM di cisteamina, 0.3 mM di cistina e 50 µg/ml kanamicina.

Durante le fasi di lavaggio gli oociti sono stati tenuti in TCM199 + 10% di FCS, tamponato con 15 mM di HEPES e 5 mM di bicarbonato di sodio (H199).

Come medium di fertilizzazione è stato usato il Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (Lu et al 1987) a cui sono state aggiunte 0.2 mM di penicillamina, 0.1 mM di ipotaurina e 0.01 mM di eparina.

Il medium di coltura usato è stato il SOF che contiene aminoacidi essenziali e non, e 8 mg/ml di Albumina Sierica Bovina (Tervit et al 1972).

Sia i media di fertilizzazione che di coltura sono stati tamponati con 25 mM di bicarbonato di sodio che è stato poi sostituito da 20 mM di HEPES e 5 mM di bicarbonato di sodio quando gli oociti e gli embrioni sono stati processati al di fuori degli incubatori a CO<sub>2</sub>.

#### 2.3.2.2 RECUPERO DEGLI OOCITI E MATURAZIONE IN VITRO

Le ovaie di bufalo sono state raccolte al macello e trasportate, entro le 3-4 ore dalla macellazione, al laboratorio in soluzione fisiologica antibiotata con 150 mg/l di kanamicina ad una temperatura di circa 35°C.

I COC sono stati raccolti mediante aspirazione di follicoli con diametro compreso fra i 2 e gli 8 mm, usando un ago di 18 G connesso ad una pompa di aspirazione operante ad una pressione negativa controllata (40–50 mmHg). I COC raccolti sono stati quindi classificati morfologicamente: solo quelli con un cumulo compatto e non atresico e citoplasma omogeneo sono stati utilizzati per la fase sperimentale.

I COC selezionati sono stati abbondantemente lavati in H199, con un singolo lavaggio nel terreno finale di maturazione, quindi sono stati posti in gocce da 50 µl (10 COC/goccia) dello stesso medium, coperte con olio minerale.

La IVM è stata effettuata alla temperatura di 38.5°C per 22–24 ore in atmosfera gassosa controllata con il 5% di CO<sub>2</sub> in aria umidificata.

### 2.3.2.3 VITRIFICAZIONE E RISCALDAMENTO

Tutti i media di vitrificazione e di riscaldamento sono stati preparati a partire da un terreno base di TCM-199 tamponato con HEPES e supplementato con il 20 % di FCS (TB). I media sono stati tenuti a temperatura ambiente per almeno 1 h prima dell'inizio della procedura.

Gli oociti dopo l'IVM sono stati lavati, denudati in H199 + 10 % FCS e vitrificati/riscaldati utilizzando la metodica CTV (Kuwayama and Kato, 2000). Gli oociti sono stati esposti a soluzioni vitrificanti e riscaldanti contenenti differenti concentrazioni di CP, così come specificato per ciascun gruppo nel disegno sperimentale. In generale, sono stati posti in una prima soluzione (SV1) per 3 minuti e poi trasferiti in quella finale (SV2) per 20-25 sec. Gli oociti sono stati, così, presi mediante una pipetta a bocca nel minor volume possibile di SV2 (<0,1 µl) e messi sull'estremità di un cryotop (Figura 10). La soluzione è stata quasi interamente rimossa mediante aspirazione con la pipetta a bocca (Figura 11) e lo strumento immerso in LN<sub>2</sub>.



**Figura 10:** Oociti caricati sul CT



**Figura 11:** Oociti sul CT dopo aspirazione della soluzione vitrificante

Per il riscaldamento il cryotop è stato prelevato dall' $LN_2$  e la linguetta sottile su cui erano stati precedentemente posti gli oociti è stata immediatamente immersa nella prima soluzione di riscaldamento. Gli oociti sono stati infine lavati in H199 con 10 % di FCS e rimessi nel medium di maturazione per 1.5 ore prima della IVF.

#### 2.3.2.4 FECONDAZIONE IN VITRO E COLTURA IN VITRO

Gli spermatozoi utilizzati 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 procedura dello swim-up per 1 ora, utilizzando il medium Ham's. Il pellet ottenuto dopo la centrifugazione del surnatante è stato risospeso in modo da raggiungere una concentrazione

di  $2 \times 10^6$ /ml nel medium di fecondazione. L'inseminazione è stata eseguita in gocce di 50  $\mu$ l di medium di fecondazione coperto da olio minerale (5 oociti/goccia), quindi i gameti sono stati incubati per 20-22 ore a 38.5°C in presenza del 5% di CO<sub>2</sub>.

Circa 20 ore dopo l'IVF, i presunti zigoti sono stati rimossi dal medium di fecondazione, privati del cumulo mediante ripetuto spipettamento, lavati due volte in medium SOF tamponato con HEPES e distribuiti in gocce da 20  $\mu$ l di SOF tamponato con bicarbonato di sodio. La coltura in vitro è stata eseguita in camere modulari a tenuta, nelle quali veniva insufflata una miscela gassosa composta dal 5% di CO<sub>2</sub>, 7% di O<sub>2</sub> e 88% di N<sub>2</sub> a 38.5°C.

### 2.3.2.5 VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA

La sopravvivenza degli oociti è stata morfologicamente valutata subito prima della IVF (giorno 0) e dopo 24 h di coltura (giorno 1). Gli oociti con alterazioni strutturali, quali estrusione o coartazione del citoplasma e rottura della ZP e/o membrana plasmatica, sono stati considerati come non sopravvissuti.

La valutazione del cleavage, ovvero la percentuale di embrioni divisi a due cellule, è stata valutata al giorno 5 di coltura (giorno 0 = giorno

dell'IVF). Gli oociti indivisi sono stati eliminati dalle piastre, e gli embrioni trasferiti in un terreno fresco per ulteriori 2 giorni. La resa embrionale, intesa come percentuale di blastocisti , è stata valutata al giorno 7.

### 2.3.3 Disegno sperimentale

Oociti di bufalo maturati in vitro (N=471) sono stati denudati in TB mediante gentile spipettamento, suddivisi in 4 gruppi uniformi e sottoposti a vitrificazione e riscaldamento.

Inoltre, un gruppo di oociti maturati in vitro (N=112) non sono stati sottoposti a vitrificazione/riscaldamento ma sono stati direttamente fecondati e poi coltivati in vitro (Gruppo controllo). L'esperimento è stato ripetuto 5 volte.

#### 2.3.3.1 GRUPPO 1

##### *a) Fase di vitrificazione*

Un totale di 119 oociti, in gruppi di 5, sono stati posti in gocce da 200 µl di TB contenente 7.5 % di DMSO e 7.5 % di GE (SV1) per 3 minuti. Successivamente, sono stati trasferiti in gocce da 50 µl di una soluzione

0.5 M di saccarosio in TB contenente 16.5 % di DMSO e 16.5 % di GE (SV2) per 20-25 secondi.

*b) Fase di riscaldamento*

L'estremità del cryotop è stata immediatamente immersa in circa 1 ml di 1.25 M di saccarosio in TB per 1 minuto. Gli oociti recuperati sono stati trasferiti, mediante passaggi seriali di 30 secondi ognuno, in gocce di soluzioni decrescenti di saccarosio (0.625 M, 0.42 M e 0.31 M).

### 2.3.3.2 GRUPPO 2

*a) Fase di vitrificazione*

Un totale di 111 oociti, in gruppi di 5, sono stati posti in gocce da 200 µl di TB contenente 10 % di DMSO e 10 % di GE (SV1) per 3 minuti. Successivamente, gli oociti sono stati trasferiti in gocce da 50 µl di una soluzione 0.5 M di saccarosio in TB contenente 20 % di DMSO e 20 % di GE (SV2) per 20-25 secondi.

*b) Fase di riscaldamento*

Per questo gruppo sperimentale è stato utilizzato lo stesso protocollo di riscaldamento del Gruppo 1.

### 2.3.3.3 GRUPPO 3

#### *a) Fase di vitrificazione*

Per questo gruppo sperimentale (N=119) è stato utilizzato lo stesso protocollo di vitrificazione del Gruppo 1.

#### *b) Fase di riscaldamento*

L'estremità del cryotop è stata immediatamente immersa in circa 1 ml di una soluzione di saccarosio 0.25 M in TB per 1 minuto. Gli oociti sono stati poi trasferiti per 5 minuti in una seconda soluzione di riscaldamento, costituita da 0.15 M di saccarosio in TB.

### 2.3.3.4 GRUPPO 4

#### *a) Fase di vitrificazione*

Per questo gruppo sperimentale (N=122) è stato utilizzato lo stesso protocollo di vitrificazione del Gruppo 2.

#### *b) Fase di riscaldamento*

Per questo gruppo sperimentale è stato utilizzato lo stesso protocollo di riscaldamento del Gruppo 3.

## 2.3 4 Analisi statistica

Le differenze tra i gruppi nelle percentuali di sopravvivenza, valutata sia al momento della fecondazione che al giorno 1 della messa in coltura, di cleavage e di blastocisti sono state analizzate con il test del Chi-quadro.

## 2.3.5 Risultati

La percentuale di sopravvivenza, valutata prima della IVF, è diminuita ( $P < 0.01$ ) in tutti i gruppi di vitrificazione rispetto al controllo fresco (Figura 12). Tra i gruppi di vitrificazione è stato osservato che la percentuale di sopravvivenza nel Gruppo 4 è stata significativamente ( $P < 0.05$ ) inferiore rispetto ai Gruppi 1 e 2.

Analogamente la percentuale di sopravvivenza, valutata dopo 24 h dal riscaldamento, è risultata ridotta ( $P < 0.01$ ) in tutti i gruppi di vitrificazione rispetto al controllo fresco. Tra i gruppi di vitrificazione tale percentuale è stata significativamente ( $P < 0.01$ ) superiore nei Gruppi 1 e 2 rispetto ai Gruppi 3 e 4.

Se si confrontano le percentuali di sopravvivenza valutate al giorno 0 ed al giorno 1 in ciascun gruppo sperimentale (Figura 13), si osserva che

solo nel Gruppo 2 non vi è stato un peggioramento della sopravvivenza dal giorno 0 al giorno 1 di coltura. Infatti, nel Gruppo 1 è stato osservato un decremento ( $P < 0.05$ ) al giorno 1 rispetto al giorno 0 e nei Gruppi 3 e 4 si è avuta una riduzione notevole ( $P < 0.01$ ).

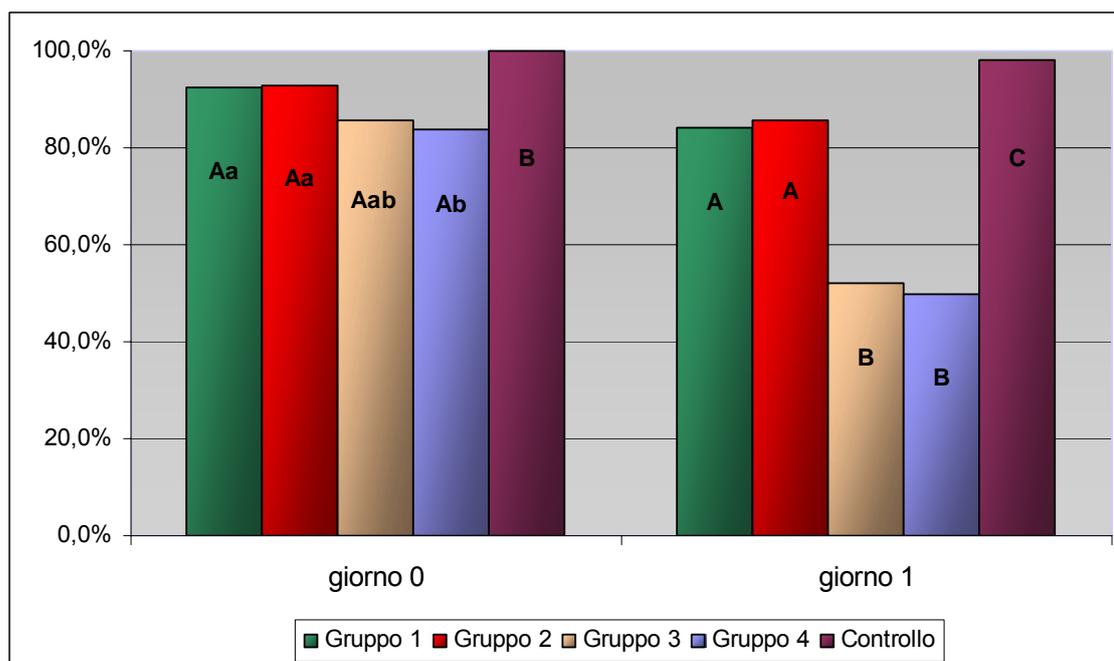
La percentuale di cleavage, valutata sui sopravvissuti al giorno 0 (Figura 14), in tutti i Gruppi di vitrificazione è stata inferiore rispetto al controllo degli oociti freschi. Questa differenza nei confronti dei Gruppi 1, 3 e 4 è stata altamente significativa ( $P < 0.01$ ), mentre nei confronti del Gruppo 2, dove è stata ottenuta una percentuale più elevata, si è ridotta al 5 %. Tra i trattati, il Gruppo 2 ha presentato una percentuale di cleavage significativamente ( $P < 0.01$ ) più elevata rispetto ai Gruppi 3 e 4, ma non è risultata differente rispetto al Gruppo 1. Nel Gruppo 1 la percentuale di cleavage sui sopravvissuti al giorno 0 è stata significativamente ( $P < 0.05$ ) più elevata rispetto al Gruppo 3.

Quando le percentuali di cleavage sono state calcolate sui sopravvissuti al giorno 1 (Figura 15) non c'è stata alcuna differenza statistica tra i gruppi trattati. I Gruppi 2 e 4 hanno dato percentuali simili al controllo, mentre tale percentuale nel Gruppo 1 ( $P < 0.01$ ) e nel Gruppo 3 ( $P < 0.05$ ) è stata inferiore rispetto al controllo.

La percentuale di blastocisti, valutata sui sopravvissuti al giorno 0 (Figura 16), è diminuita ( $P < 0.01$ ) in tutti i gruppi di vitrificazione rispetto al controllo fresco e nessuna differenza è stata evidenziata tra i trattati.

Anche la percentuale di blastocisti, valutata sui sopravvissuti al giorno 1 (Figura 17), è risultata ridotta in tutti i gruppi di trattamento rispetto al controllo. La differenza è risultata più marcata per i Gruppi 1 e 2 ( $P < 0.01$ ) rispetto a quelli 3 e 4 ( $P < 0.05$ ).

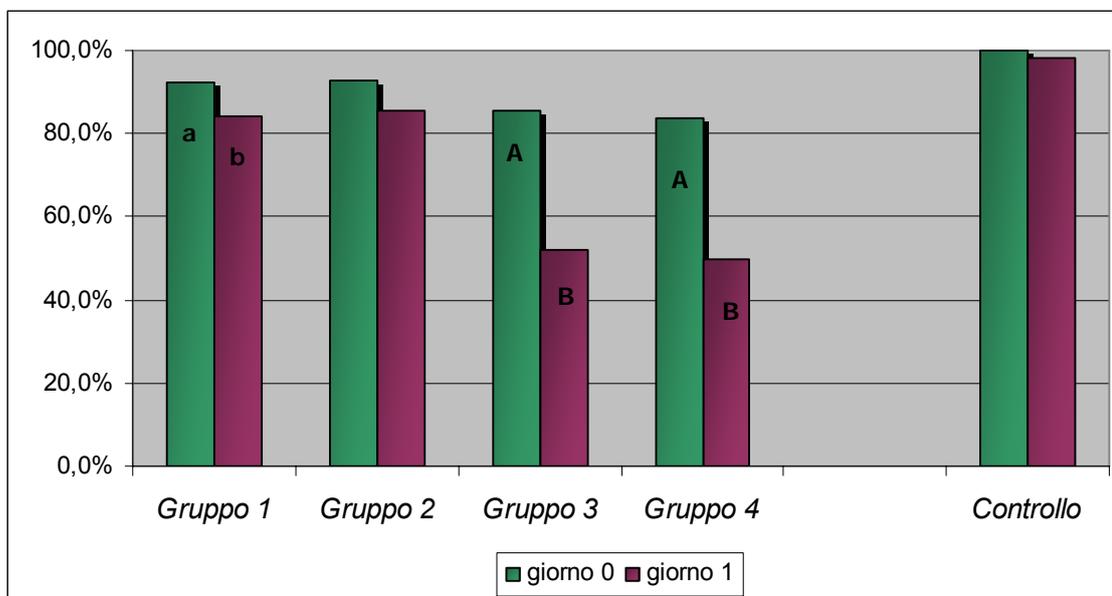
**Figura 12:** Sopravvivenza di oociti vitrificati con CTV utilizzando differenti concentrazioni di CP, valutata dopo il riscaldamento (giorno 0) ed a 24 h (giorno 1)



Vitrificati	N.	Sopravvivenza giorno 0 N. (%)	Sopravvivenza giorno 1 N. (%)
<i>Gruppo 1</i>	119	110 (92,4) <sup>Aa</sup>	100 (84) <sup>A</sup>
<i>Gruppo 2</i>	111	103 (92,8) <sup>Aa</sup>	95 (85,6) <sup>A</sup>
<i>Gruppo 3</i>	119	102 (85,7) <sup>Aab</sup>	53 (52) <sup>B</sup>
<i>Gruppo 4</i>	122	102 (83,6) <sup>Ab</sup>	61 (50) <sup>B</sup>
<i>Freschi (controllo)</i>	112	112 (100) <sup>B</sup>	110 (98,2) <sup>C</sup>

<sup>a,b</sup> valori con lettere differenti nella stessa colonna sono significativamente differenti; P<0.05  
<sup>A,B,C</sup> valori con lettere differenti nella stessa colonna sono significativamente differenti; P<0.01

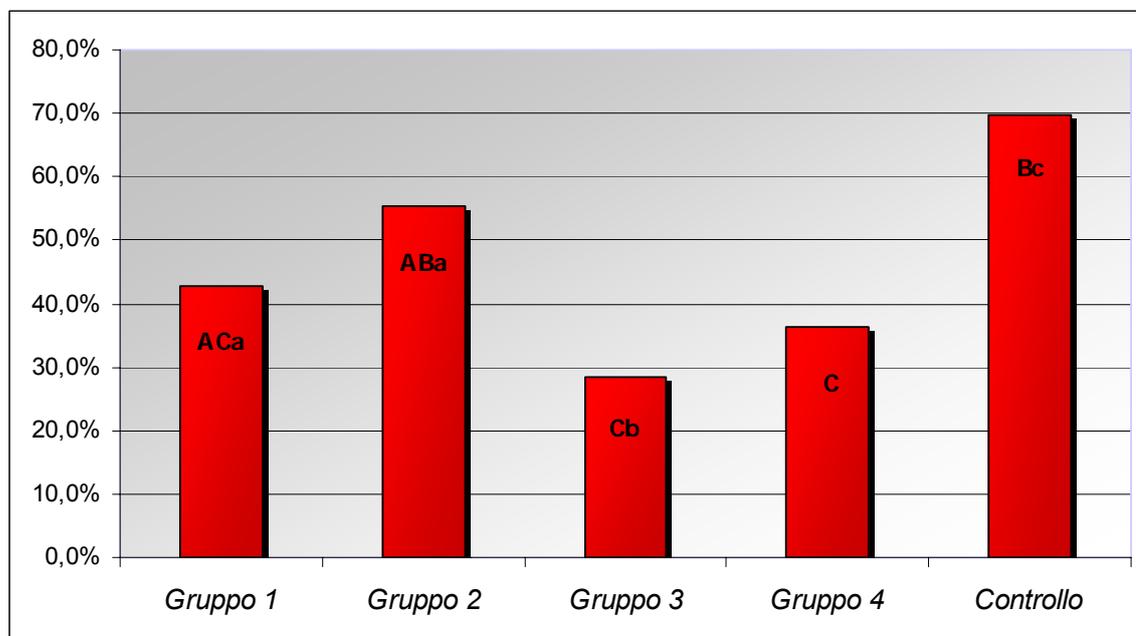
**Figura 13:** Sopravvivenza al giorno 0 ed al giorno 1 di oociti vitrificati con il CTV, utilizzando differenti concentrazioni di CP, valutata all'interno di ciascun gruppo



	<i>Vitrificati Gruppo 1</i>	<i>Vitrificati Gruppo 2</i>	<i>Vitrificati Gruppo 3</i>	<i>Vitrificati Gruppo 4</i>	<i>Freschi (controllo)</i>
<b>N.</b>	119	111	119	122	112
<b>Sopravvivenza a giorno 0</b>	110 (92,4) <sup>a</sup>	103 (92,8)	102 (85,7) <sup>A</sup>	102 (83,6) <sup>A</sup>	112 (100)
<b>Sopravvivenza a giorno 1</b>	100 (84) <sup>b</sup>	95 (85,6)	53 (52) <sup>B</sup>	61 (50) <sup>B</sup>	110 (98,2)

<sup>a,b</sup> valori con lettere differenti nella stessa colonna sono significativamente differenti; P<0.05  
<sup>A,B</sup> valori con lettere differenti nella stessa colonna sono significativamente differenti; P<0.01

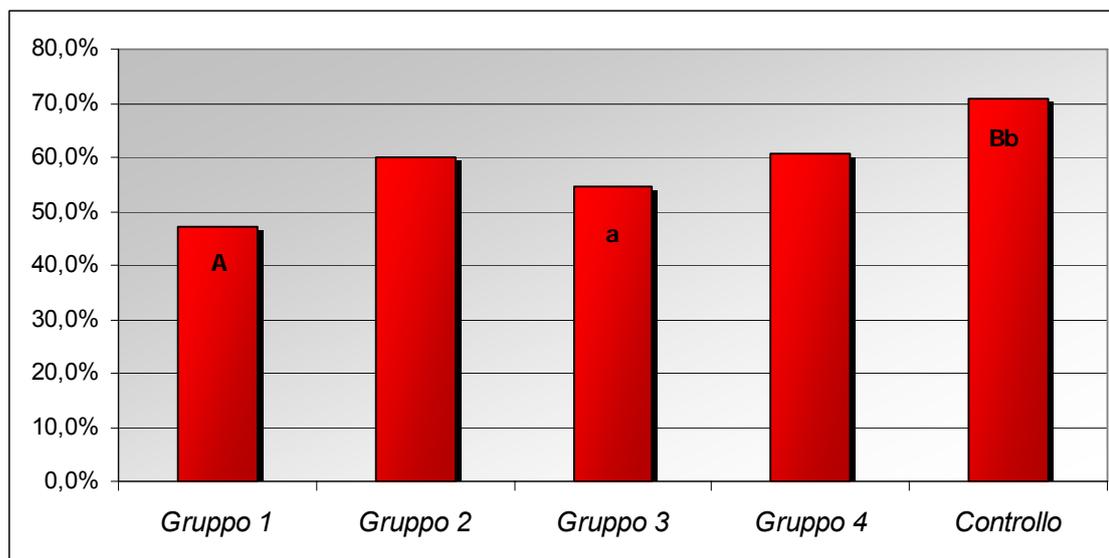
**Figura 14:** Percentuali di cleavage di oociti vitrificati con il CTV, utilizzando differenti concentrazioni di CP, valutate sul numero di oociti sopravvissuti dopo il riscaldamento (giorno 0)



Vitrificati	N. sopravvissuti giorno 0	Divisi/sopravvissuti giorno 0 N. (%)
<i>Gruppo 1</i>	110	47 (42,7) <sup>ACa</sup>
<i>Gruppo 2</i>	103	57 (55,3) <sup>ABa</sup>
<i>Gruppo 3</i>	102	29 (28,4) <sup>Cb</sup>
<i>Gruppo 4</i>	102	37 (36,3) <sup>C</sup>
<i>Freschi (controllo)</i>	112	78 (69,6) <sup>Bc</sup>

<sup>a,b,c</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.05  
<sup>A,B,C</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.01

**Figura 15:** Percentuali di cleavage di oociti vitrificati con il CTV, utilizzando differenti concentrazioni di CP, valutate sul numero di oociti sopravvissuti dopo 24 h (giorno 1)

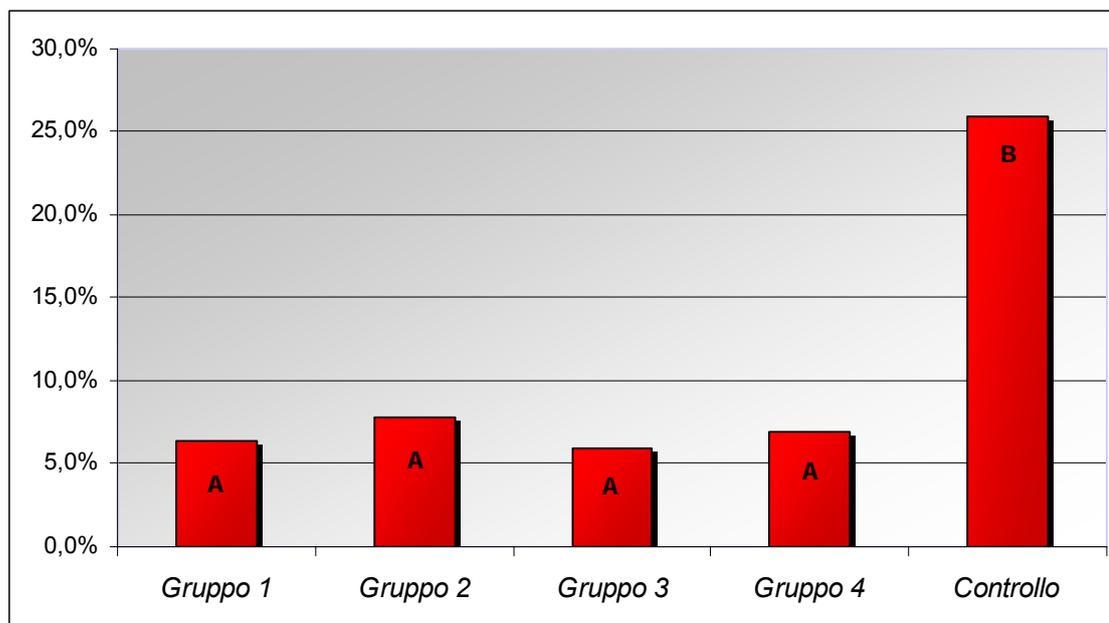


Vitrificati	N. sopravvissuti giorno 1	Divisi/sopravvissuti giorno 1 N. (%)
Gruppo 1	100	47 (47) <sup>A</sup>
Gruppo 2	95	57 (60)
Gruppo 3	53	29 (54,7) <sup>a</sup>
Gruppo 4	61	37 (60,6)
<i>Freschi</i> (controllo)	110	78 (71) <sup>Bb</sup>

<sup>a,b</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.05

<sup>A,B</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.01

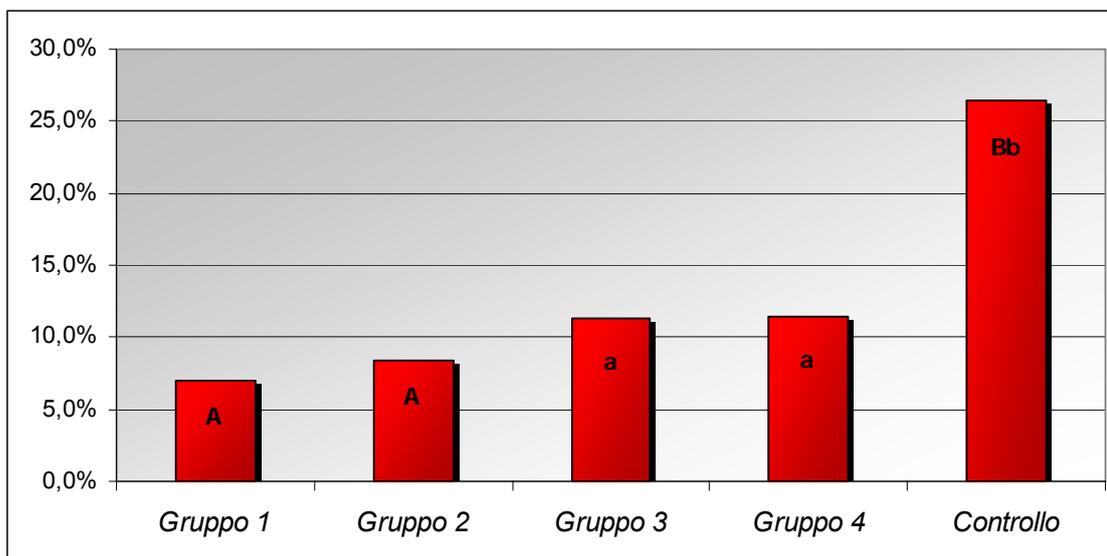
**Figura 16:** Resa in blastocisti (BI) di oociti vitrificati con il CTV, utilizzando differenti concentrazioni di CP, valutata sul numero di oociti sopravvissuti dopo il riscaldamento (giorno 0)



Vitrificati	N. sopravvissuti giorno 0	BI/sopravvissuti giorno 0 N. (%)
<i>Gruppo 1</i>	110	7 (6,4) <sup>A</sup>
<i>Gruppo 2</i>	103	8 (7,8) <sup>A</sup>
<i>Gruppo 3</i>	102	6 (5,9) <sup>A</sup>
<i>Gruppo 4</i>	102	7 (6,9) <sup>A</sup>
Freschi (Controllo)	112	29 (25,9) <sup>B</sup>

<sup>A,B</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.01

**Figura 17:** Resa in in blastocisti (BI) di oociti vitrificati con il CTV, utilizzando differenti concentrazioni di CP, valutata sul numero di oociti sopravvissuti dopo 24 h (giorno 1)



Vitrificati	N. sopravvissuti giorno 1	BI/sopravvissuti giorno 1 N. (%)
Gruppo 1	100	7 (7) <sup>A</sup>
Gruppo 2	95	8 (8,4) <sup>A</sup>
Gruppo 3	53	6 (11,3) <sup>a</sup>
Gruppo 4	61	7 (11,5) <sup>a</sup>
Freschi (Controllo)	110	29 (26,4) <sup>Bb</sup>

<sup>a,b</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.05

<sup>A,B</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.01

## **2.4 ESPERIMENTO 3: *Miglioramento della fecondazione in vitro di oociti vitrificati mediante CTV***

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

I risultati dei precedenti esperimenti suggeriscono che, dei vari metodi testati, il CTV, con le concentrazioni più elevate di GE e DMSO durante la vitrificazione e con una fase di riscaldamento multistep, partendo da una concentrazione di saccarosio maggiore (Gruppo 2), ha determinato un significativo incremento dell'efficienza, perlomeno in termini di cleavage. Per tale ragione si ritiene che tale strumento sia il più idoneo per la crioconservazione degli oociti di bufalo e che altri aspetti vadano investigati per ottimizzare l'efficienza della vitrificazione. Un aspetto importante, emerso nel corso del primo esperimento è che è preferibile denudare gli oociti prima della vitrificazione, come indicato dai peggiori risultati ottenuti vitrificando COC. È ipotizzabile che le cellule del cumulo interferiscano con la diffusione dei CP che, pertanto, non riescono a proteggere efficacemente le cellule dai danni da freddo. D'altra parte, sempre nel primo esperimento, è stata dimostrata l'importanza fondamentale delle cellule del cumulo per un corretto espletamento del processo di fecondazione e per lo sviluppo embrionale successivo; infatti

un significativo decremento delle percentuali sia di cleavage che di blastocisti è stato osservato semplicemente rimuovendo le cellule del cumulo prima della IVF in oociti freschi, cioè non sottoposti a procedure di vitrificazione. In altri termini, siamo costretti a rimuovere le cellule del cumulo per migliorare la resistenza alla vitrificazione ma, così facendo, il processo di fecondazione degli oociti dopo il riscaldamento potrebbe essere ostacolato proprio dall' assenza delle cellule.

Nei bovini si è ovviato a questo problema effettuando un parziale denudamento degli oociti prima di sottoporli alla vitrificazione. Questo approccio, però, non risulta eseguibile nella specie bufalina, data la lassità di legame delle cellule del cumulo all'ocita stesso (Gasparini B., 2002) . Ne consegue la necessità di individuare strategie alternative in questa specie per superare questo impedimento.

Lo scopo di questo esperimento è stato quello di verificare l'efficienza di un supporto somatico durante la fecondazione in vitro di oociti di bufalo vitrificati senza cellule del cumulo. A tale fine sono stati confrontati diversi approcci per fornire tale supporto ed, in particolare:

- 1) aggiunta di cellule del cumulo in sospensione al medium di IVF
- 2) IVF effettuata su un monostrato di cellule del cumulo
- 3) co-coltura con COC bovini durante la IVF.

## 2.4.2 Materiali e metodi

### 2.4.2.1 RECUPERO DEGLI OOCITI

Le ovaia 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 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 (Neglia et al., 2003), caratterizzati da cumulo compatto e non atresico e citoplasma omogeneo, sono stati utilizzati per la fase sperimentale.

### 2.4.2.2 MATURAZIONE IN VITRO

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 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, 0.3 mM di cistina e 50 µg/ml di kanamicina. I COC selezionati sono stati lavati in TCM 199, tamponato con 15 mM di HEPES e 5 mM di bicarbonato di sodio (H199) ed addizionato del 10 % di FCS, e posti in gocce di 50 µl (10 COC/goccia), coperte di olio minerale, del terreno finale di maturazione. 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.

### 2.4.2.3 VITRIFICAZIONE

In gruppi di 5, gli oociti sono stati posti in gocce da 200 µl di H199 + 20 % di FCS (TB), contenente 7.5 % di DMSO e 7.5 % di GE (SV1) per 3 minuti. Successivamente, gli oociti sono stati trasferiti in gocce da 50 µl di una soluzione 0.5 M di saccarosio in TB contenente 16.5 % di DMSO e 16.5 % di GE (SV2) per 20-25 secondi. Gli oociti sono stati, così, presi mediante una pipetta a bocca nel minor volume possibile di SV2 (<0,1 µl), messi sull'estremità di un cryotop ed immersi in LN<sub>2</sub>.

#### 2.4.2.4 RISCALDAMENTO

Il cryotop è stato prelevato dall'LN<sub>2</sub> e la linguetta sottile su cui erano stati precedentemente posti gli oociti è stata immediatamente immersa in circa 1 ml di 1.25 M di saccarosio in TB per 1 minuto. Gli oociti recuperati sono stati trasferiti, mediante passaggi seriali di 30 secondi ognuno, in gocce di soluzioni decrescenti di saccarosio (0.625 M, 0.42 M e 0.31 M). Gli oociti sono stati infine lavati in H199 con 10 % di FCS e rimessi nel medium di maturazione per 1.5 ore prima della IVF.

#### 2.4.2.5 FECONDAZIONE IN VITRO

Gli spermatozoi per la IVF sono stati ottenuti da seme congelato/scongelato di un toro precedentemente testato. 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 raggiungere una concentrazione finale di  $2 \times 10^6$ /ml nel terreno di fecondazione, costituito dal medium Tyrode's 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 da 50  $\mu$ l (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.

#### 2.4.2.6 CO-COLTURA DURANTE L'IVF

##### *2.4.2.6.1 Cellule del cumulo in sospensione*

Con l'ausilio di una pipetta a bocca, gruppi di cellule del cumulo sono stati prelevati da oociti di bufalo maturati in vitro, prima di essere denudati per la vitrificazione. Tali gruppi cellulari sono stati aggiunti a gocce da 50 µl di medium di fecondazione preparate come precedentemente descritto, arricchite con il 2 % di FCS. Mediante gentile spipettamento le cellule sono state separate all'interno di ciascuna goccia e lasciate in sospensione.

##### *2.4.2.6.2 Cellule del cumulo in monostrato*

Il giorno prima dell'inizio della coltura bufalina, sono state prelevate al macello ovaia bovine e trasportate in laboratorio in soluzione fisiologica antibiotata a 30-35 °C. Le ovaia sono state aspirate e gli oociti recuperati

sono stati selezionati. Solo oociti con citoplasma omogeneo e cumulo compatto sono stati messi in un medium di maturazione costituito da Medium 199 supplementato con 0.8 mM di L-glutamina, 50 µg/ml di gentamicina, 5 µg/ml di LH, 0.5 µg/ml di FSH e 15 % di siero bovino (BS). Dopo 24 ore, con l'ausilio di una pipetta a bocca, gruppi di cellule del cumulo sono stati prelevati dagli oociti bovini maturati in vitro e sono stati distribuiti in gocce da 50 µl di un terreno commerciale, il TCM 199 tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio ed addizionato di FCS al 10 %, 0.2 mM di piruvato di sodio e 50 µg/ml di kanamicina (B199 + 10 % FCS). Mediante gentile spipettamento le cellule sono state separate all'interno di ciascuna goccia e lasciate per 20-24 h ad una temperatura di 38.5°C, in atmosfera gassosa controllata con il 5 % di CO<sub>2</sub> in aria umidificata.

Il giorno dopo, coincidente con il giorno della vitrificazione e della IVF degli oociti di bufalo, le cellule del cumulo in monostrato sono state lavate con il medium di fecondazione bufalino addizionato del 2 % di FCS per eliminare le cellule del cumulo in eccesso rimaste in sospensione. Il medium B199 + 10 % FCS è stato sostituito dal medium di fecondazione + 2% di FCS.

#### 2.4.2.6.3 Co-coltura con COC bovini

Lo stesso giorno di raccolta delle ovaia bufaline, per il recupero di oociti da maturare e vitrificare, sono state prelevate presso un macello locale ovaia bovine e trasportate in laboratorio in soluzione fisiologica antibiotata. Le ovaia sono state aspirate e gli oociti recuperati sono stati selezionati. Solo oociti con citoplasma omogeneo e cumulo compatto sono stati messi in un medium di maturazione costituito da Medium 199 supplementato con 0.8 mM di L-glutamina, 50 µg/ml di gentamicina, 5 µg/ml di LH, 0.5 µg/ml di FSH e 15 % di BS. Il giorno seguente, al momento della IVF degli oociti di bufalo vitrificati-riscaldati, gli oociti bovini maturati in vitro sono stati lavati due volte nel Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (Lu et al 1987) e trasferiti nel medium di IVF in co-coltura con oociti bufalini vitrificati/riscaldati in rapporto 1:1 (3 COCs bovini + 3 oociti nudi bufalini /goccia).

#### 2.4.2.7 COLTURA IN VITRO

Circa 20 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

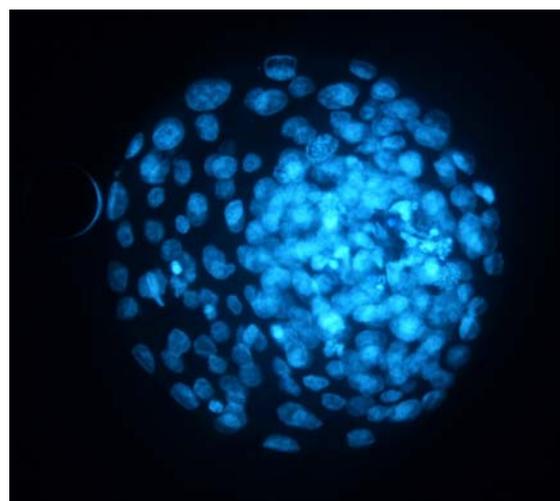
(Tervit HR. et al., 1972). La coltura in vitro è stata effettuata in camere modulari a tenuta, nelle quali è stata insufflata una miscela gassosa con il 5 % di CO<sub>2</sub>, il 7 % di O<sub>2</sub> e l' 88 % di N<sub>2</sub>, alla temperatura di 38.5°C.

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 è stata valutata al giorno 7 (Figura 18).

I dati di divisione e resa embrionale osservati al microscopio ottico sono stati confermati in seguito a fissazione in metanolo al 60 % in PBS e colorazione con HOECHST 33342 del materiale nucleare (Figura 19). L'osservazione è stata effettuata con un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse 90i.



**Figura 18:** Blastocisti di bufalo osservata in campo chiaro



**Figura 19:** Blastocisti di bufalo osservata alla fluorescenza dopo colorazione con HOECHST

#### 2.4.2.8 VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA

Gli oociti con alterazioni strutturali, quali estrusione o coartazione del citoplasma e rottura della ZP e/o membrana plasmatica, sono stati considerati come non sopravvissuti.

La sopravvivenza degli oociti nei vari gruppi sperimentali è stata valutata morfologicamente dopo 24 h di coltura (giorno 1).

La valutazione del cleavage, ovvero la percentuale di embrioni divisi a due cellule, è stata valutata al giorno 5 di coltura (giorno 0 = giorno dell'IVF). Gli oociti indivisi sono stati eliminati dalle piastre, e gli embrioni trasferiti in un terreno fresco per ulteriori 2 giorni. La resa embrionale, intesa come percentuale di blastocisti è stata valutata al giorno 7.

#### 2.4.3 Disegno sperimentale

Un totale di 640 oociti, maturati in vitro e denudati in TB, è stato vitrificato/riscaldato secondo la metodica sopra descritta.

Al giorno 0, ovvero dopo 1.5 ore di riposo post-riscaldamento in medium di maturazione, gli oociti sopravvissuti ( $587/640 = 91.7\%$  di sopravvivenza) sono stati equamente suddivisi in 4 gruppi sperimentali, differenti tra loro nelle condizioni di fecondazione:

Gruppo A: 172 oociti nudi fecondati in assenza di supporto somatico  
(*controllo vitrificati*);

Gruppo B: 138 oociti nudi fecondati in presenza di cellule del cumulo omospecifiche in sospensione;

Gruppo C: 139 oociti nudi fecondati su monostrato di cellule del cumulo di bovino;

Gruppo D: 138 oociti nudi fecondati in presenza di COC bovini.

Un Gruppo controllo (N=121) è stato maturato, fecondato e coltivato in vitro secondo il protocollo precedentemente descritto senza essere sottoposto a vitrificazione.

#### **3.4.4 Analisi statistica**

Le differenze tra i gruppi nelle percentuali di sopravvivenza, valutata al giorno 1 della messa in coltura, di cleavage e di blastocisti, sono state analizzate con il test del Chi-quadro.

### 3.4.5 Risultati

La percentuale di sopravvivenza, valutata dopo 24 h dalla IVF (Figura 20), non è stata significativamente differente tra i gruppi di vitrificazione. Tale percentuale nel Gruppo controllo è risultata significativamente maggiore rispetto ai Gruppi A ( $P<0.05$ ), B e C ( $P<0.01$ ), mentre nessuna differenza è stata osservata rispetto al Gruppo D.

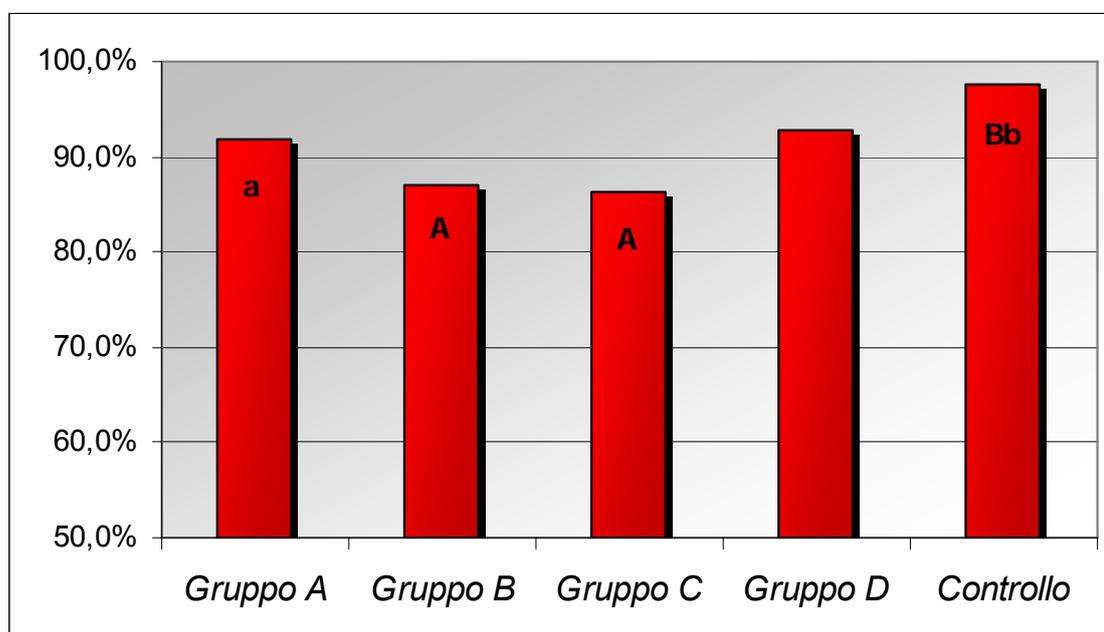
Il Gruppo controllo ha riportato una percentuale di cleavage (Figura 21), valutata sul totale di oociti vitrificati e riscaldati, significativamente ( $P<0.01$ ) superiore rispetto ai Gruppi A, B e C, mentre non è risultata differente rispetto al Gruppo D. Infatti il Gruppo D è quello che ha dato la percentuale di cleavage migliore rispetto a tutti i gruppi di vitrificazione (D vs A e B,  $P<0.01$ ; D vs C,  $P<0.05$ ).

Quando la percentuale di cleavage è stata valutata sugli oociti sopravvissuti dopo 24 h (Figura 21), il Gruppo controllo ha riportato valori più elevati rispetto ai Gruppi A ( $P<0.01$ ), B ( $P<0.01$ ) e C ( $P<0.05$ ), ma non differenti rispetto a D. Il Gruppo D ha dato una percentuale di cleavage significativamente ( $P<0.01$ ) maggiore rispetto ai Gruppi A e B, ma nessuna differenza è stata osservata con il Gruppo C.

In tutti i gruppi di vitrificazione è stata descritta una riduzione ( $P<0.01$ ) della percentuale di blastocisti (Figura 22), valutata sia sul totale di oociti

vitrificati/riscaldati che su quelli sopravvissuti dopo 24 h dal riscaldamento, rispetto al Gruppo controllo.

**Figura 20:** Sopravvivenza di oociti vitrificati con CTV, nelle diverse condizioni di IVF, valutata dopo 24 h dal riscaldamento

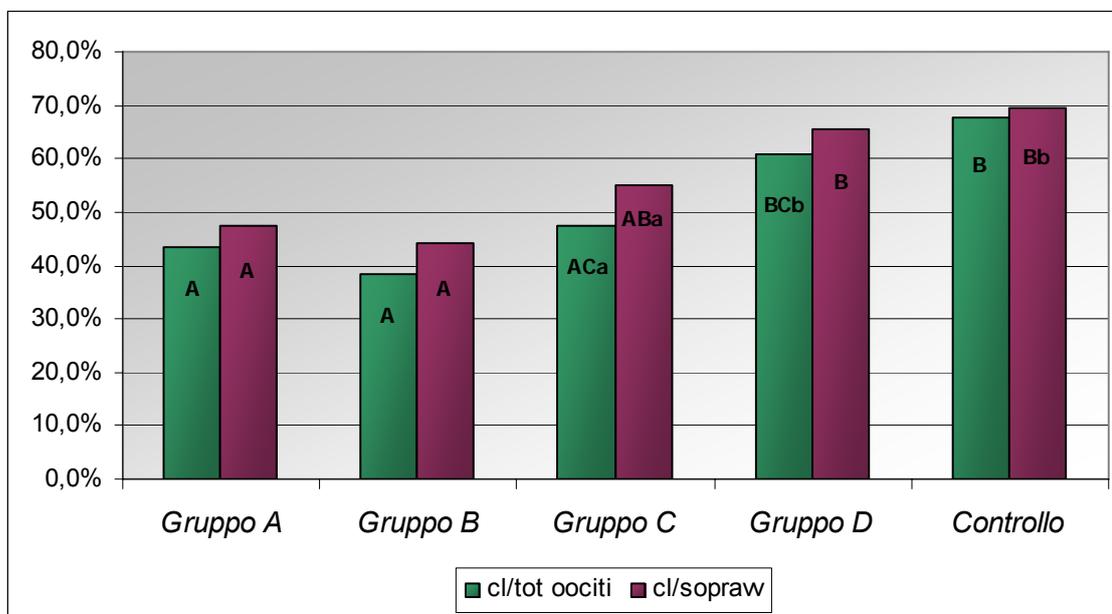


Vitrificati	N.	Sopravvissuti dopo 24 h (giorno 1) N. (%)
Gruppo A	172	158 (91.8) <sup>a</sup>
Gruppo B	138	120 (86.9) <sup>A</sup>
Gruppo C	139	120 (86.3) <sup>A</sup>
Gruppo D	138	128 (92.7)
Freschi (Controllo)	121	118 (97.5) <sup>Bb</sup>

<sup>a,b</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.05

<sup>A,B</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.01

**Figura 21:** Percentuali di cleavage di oociti vitrificati con CTV, nelle diverse condizioni di IVF, valutate sul totale di oociti vitrificati e sui sopravvissuti dopo 24 ore dal riscaldamento

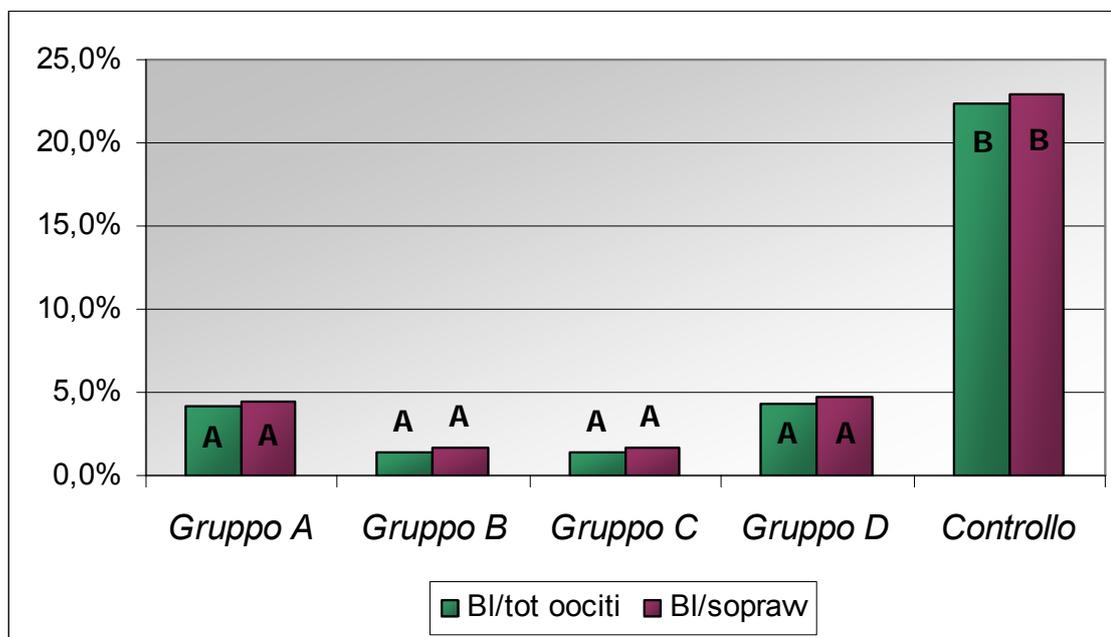


Vitrificati	N. oociti	Sopravvissuti dopo 24h	Divisi/totale oociti N. (%)	Divisi/sopravvissuti dopo 24 h N. (%)
Gruppo A	172	158	75 (43.6) <sup>A</sup>	75 (47.5) <sup>A</sup>
Gruppo B	138	120	53 (38.4) <sup>A</sup>	53 (44.2) <sup>A</sup>
Gruppo C	139	120	66 (47.5) <sup>ACa</sup>	66 (55.0) <sup>ABa</sup>
Gruppo D	138	128	84 (60.9) <sup>BCb</sup>	84 (65.6) <sup>B</sup>
Freschi (Controllo)	121	118	82 (67.8) <sup>B</sup>	82 (69.5) <sup>Bb</sup>

<sup>a,b</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.05

<sup>A,B,C</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.01

**Figura 22:** Resa in blastocisti (BI) di oociti vitrificati con CTV, nelle diverse condizioni di IVF, valutate sul totale di oociti vitrificati e sui sopravvissuti dopo 24 ore dal riscaldamento



Vitrificati	N. oociti	Sopravvissuti dopo 24h	BI/totale oociti N. (%)	BI/sopravvissuti dopo 24 h N. (%)
<i>Gruppo A</i>	172	158	7 (4.1) <sup>A</sup>	7 (4.4) <sup>A</sup>
<i>Gruppo B</i>	138	120	2 (1.4) <sup>A</sup>	2 (1.6) <sup>A</sup>
<i>Gruppo C</i>	139	120	2 (1.4) <sup>A</sup>	2 (1.6) <sup>A</sup>
<i>Gruppo D</i>	138	128	6 (4.3) <sup>A</sup>	6 (4.7) <sup>A</sup>
Freschi ( <i>Controllo</i> )	121	118	27 (22.3) <sup>B</sup>	27 (22.9) <sup>B</sup>

<sup>A,B</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.01

## **2.5 ESPERIMENTO 4: *Studio ultrastrutturale di oociti vitrificati con il metodo CTV***

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

Dai risultati dell'Esperimento 3 si deduce che il metodo cryotop si conferma come un buon metodo per la vitrificazione di oociti di bufali maturati in vitro e che l'aggiunta di oociti bovini con le cellule del cumulo in co-coltura porta ad un aumento della percentuale di divisione ma non di resa embrionale. Si presuppone che gli oociti subiscano danni strutturali che impediscano il corretto sviluppo ad embrioni degli oociti fecondati.

In questo esperimento si è voluto effettuare uno studio preliminare sui danni subiti dall'oocita in seguito a vitrificazione, a livello del materiale cromatinico e del fuso meiotico.

## 2.5.2 Materiali e metodi

### 2.5.2.1 RECUPERO DEGLI OOCITI

Le ovaia 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 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 (Neglia et al., 2003), caratterizzati da cumulo compatto e non atresico e citoplasma omogeneo, sono stati utilizzati per la fase sperimentale.

### 2.5.2.2 MATURAZIONE IN VITRO

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 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, 0.3 mM di cistina 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 da 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.

### 2.5.2.3 VITRIFICAZIONE

In gruppi di 5 gli oociti sono stati posti in gocce da 200 µl di H199 + 20 % di FCS (TB), contenente 7.5 % di DMSO e 7.5 % di GE (SV1) per 3 minuti. Successivamente, gli oociti sono stati trasferiti in gocce da 50 µl di una soluzione 0.5 M di saccarosio in TB contenente 16.5 % di DMSO e 16.5 % di GE (SV2) per 20-25 secondi. Gli oociti sono stati, così, presi mediante una pipetta a bocca nel minor volume possibile di SV2 (<0,1 µl), messi sull'estremità di un cryotop ed immersi in LN<sub>2</sub>.

#### 2.5.2.4 RISCALDAMENTO

Il cryotop è stato prelevato dall'LN<sub>2</sub> e la linguetta sottile su cui erano stati precedentemente posti gli oociti è stata immediatamente immersa in circa 1 ml di 1.25 M di saccarosio in TB per 1 minuto. Gli oociti recuperati sono stati trasferiti, mediante passaggi seriali di 30 secondi ognuno, in gocce di soluzioni decrescenti di saccarosio (0.625 M, 0.42 M e 0.31 M). Gli oociti sono stati infine lavati in H199 con 10 % di FCS e rimessi nel medium di maturazione, se non diversamente specificato.

#### 2.5.2.5 FISSAZIONE E TECNICHE DI IMMUNOCITOCHIMICA

Gli oociti sono stati fissati e colorati usando una modifica del metodo precedentemente utilizzato da Messinger e Albertini (Messinger S.M. e Albertini D.F., 1991).

In primo luogo gli oociti sono stati fissati per 30 minuti a 37 °C in un buffer stabilizzante i microtubuli ( 0.1 M di Pipes [pH=6.9], 5 mM di MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O e 2.5 mM di EGTA) contenente il 2 % di formaldeide, lo 0.5 % di Triton X-100, il 50 % di ossido di deuterio e 1 mM di ditiotreitolo. Gli oociti sono stati poi lavati tre volte in una soluzione di bloccaggio di PBS contenente

lo 0.1 % di siero normale di capra (NGS), e poi incubati per 1 h in PBS + 10 % NGS, 0.1 % di Triton X-100 e lo 0.02 % di azide di sodio. Dopo il lavaggio gli oociti sono stati incubati per 1 h al buio a 37 °C con anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina coniugato con isotiocianato di fluoresceina (diluizione finale 1:500) in una soluzione di bloccaggio di PBS contenente il 5 % di NGS, 0.1 % di Triton X-100 e lo 0.02 % di azide di sodio. Dopo ulteriori tre lavaggi nella soluzione di bloccaggio con il 10 % di NGS, gli oociti sono stati incubati per 15 minuti in una soluzione contenente 10  $\mu$ g/ml di propidio di ioduro. Gli oociti sono stati infine montati su un vetrino portaoggetti in una goccia da 8  $\mu$ l di glicerolo e PBS in rapporto di 1:1. L'osservazione è stata effettuata mediante microscopio confocale Nikon Eclipsa 90i.

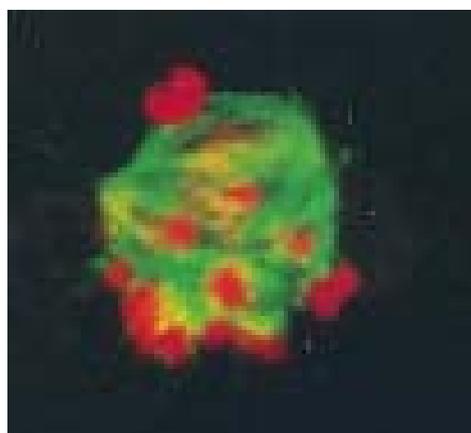
#### 2.5.2.6 VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA

L'osservazione ha consentito di distinguere il fuso meiotico in 4 categorie: a) normale, con struttura simmetrica e tipica forma a botte (Figura 23 e 24) ; b) assente, quando non visibile (Figura 25); c) anomalo, con una struttura disorganizzata, dispersa e/o disposizione multipolare e d) piccolo, con una normale morfologia ma struttura coartata e, quindi, ridotte dimensioni.

Contemporaneamente è stata valutata la morfologia cromosomica degli oociti in MII e sono state individuate 3 categorie: a) MII normale, con i cromosomi organizzati su una piastra metafasica compatta posizionata all'equatore del fuso, b) MII coartata, con morfologia normale ma dimensioni ridotte e c) MII frammentata, con i cromosomi dispersi rispetto al centro del fuso (Figura 26).



**Figura 23:** MII con cromosomi e fuso normale



**Figura 24:** MII con cromosomi e fuso anomali

### 2.5.3 Disegno sperimentale

Un totale di 199 oociti sono stati selezionati e messi in maturazione. Dopo 22 h, 65 oociti (Gruppo controllo) sono stati fissati e colorati, i restanti sono stati vitrificati e riscaldati. Al momento del riscaldamento 68 oociti (Gruppo tempo 0) sono stati fissati e colorati, mentre gli altri 66 sono stati rimessi per 2 h nel medium di maturazione

(Gruppo tempo 2 h), prima di sottoporli alla metodica di fissazione e colorazione.

#### **2.5.4 Analisi statistica**

Le differenze tra i gruppi nelle percentuali delle diverse categorie esaminate sono state analizzate mediante il test del Chi-quadro.

#### **2.5.5 Risultati**

Poiché gli oociti venivano vitrificati o fissati dopo la IVM ma senza effettivamente poter apprezzare lo stato di maturazione nucleare, quelli che non avevano raggiunto la MII (17.1 % nel controllo, 13.2 % nel tempo 0 h e 6 % nel tempo 2 h) sono stati esclusi dall'analisi.

Come mostrato in Tabella 4, è stata osservata una riduzione ( $P < 0.01$ ) della percentuale di oociti con una MII normale, sia nel corredo cromatinico che nel fuso, in entrambi i gruppi di vitrificazione, quindi sia al momento del riscaldamento che dopo 2 h di riposo, rispetto al controllo.

In particolare, negli oociti vitrificati/riscaldati, ad entrambi i tempi considerati, è stata riscontrata una maggiore incidenza di oociti con una

piastra metafisica coartata e con corrispondente fuso di ridotte dimensioni.

Un dato interessante emerso dall'analisi è quello della maggiore ( $P < 0.01$ ) incidenza di oociti con una piastra metafisica frammentata e anomalia del fuso, che è stata riscontrata a 2 h dal riscaldamento rispetto sia al tempo 0 che al controllo.

E' stato anche osservato che le anomalie del fuso erano strettamente associate a quelle della piastra metafisica; infatti, in presenza di una piastra normale, anomalie del fuso non sono state descritte affatto nel controllo e, nei gruppi di vitrificazione, solo in percentuali irrilevanti.

**Tabella 4.** Morfologia cromosomica e del fuso meiotico di oociti di bufalo freschi e vetrificati, osservati al tempo 0 e 2h dopo il riscaldamento

<b>GRUPPO</b>	<b>Controllo fresco</b>	<b>Tempo 0 h</b>	<b>Tempo 2 h</b>
<i>N. MII</i>	54	59	62
<i>MII normale con fuso normale N. (%)</i>	49 (92.4) <sup>A</sup>	32 (55.2) <sup>B</sup>	31 (50.0) <sup>B</sup>
<i>MII normale con fuso anomalo o assente N. (%)</i>	0 (0)	1 (1.7)	1 (1.6)
<i>MII coartata con fuso piccolo N. (%)</i>	1(1.9) <sup>A</sup>	17 (29.3) <sup>B</sup>	12 (19.3) <sup>B</sup>
<i>MII coartata con fuso anomalo o assente N. (%)</i>	0(0)	3 (5.2)	0 (0)
<i>MII frammentata con fuso anomalo N. (%)</i>	4 (7.4) <sup>A</sup>	6 (10) <sup>A</sup>	18 (29.0) <sup>B</sup>

<sup>A,B</sup> valori con lettere differenti sono significativamente differenti; P<0.01

## **3 DISCUSSIONE**

Negli ultimi anni si è osservato un incrementato interesse per la crioconservazione degli oociti di bufalo, in quanto il maggiore limite alla diffusione delle tecnologie di produzione embrionale in vitro (IVEP) in questa specie è rappresentato dalla bassa percentuale di recupero (da ovaia da macello: 2.4 oociti/ovaio per la bufala rispetto ai 10 oociti/ovaio nella bovina; Gasparrini et al. 2000), rendendo il rapporto costi/benefici sfavorevole. Ciò è da attribuire a diversi fattori, rappresentati dall'esigua popolazione di follicoli primordiali presenti nell'ovaio alla nascita (20.000 nella bufala rispetto ai 100.000 nella bovina; Samad H.A. and Nasser A.A., 1979; Danell B., 1987; Le Van TY et al., 1989), dal minor numero di follicoli antrali, dalla maggiore incidenza di atresia e dalla qualità più scadente degli oociti recuperabili (Gasparrini B. et al., 2000). Inoltre la bufala viene di solito macellata alla fine della sua carriera produttiva, quando la fertilità è notevolmente ridotta ed il numero di follicoli è drasticamente calato, al contrario di quanto accade nella bovina. Questa condizione ostacola severamente il progresso scientifico, poiché anche quando un pool di oociti, derivanti da animali da macello, è usato a scopo di ricerca, i numeri sono spesso così piccoli da impedire di progettare correttamente gli esperimenti. Inoltre potrebbe anche accadere che solo pochi bufali siano macellati nello stesso giorno e, per ragioni di costi, questa risorsa di materiale sperimentale è spesso persa. Da ciò risulta che la crioconservazione di oociti di bufalo potrebbe aumentare la

disponibilità di oociti sia per scopi di ricerca che per un futuro uso commerciale.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di ottimizzare le tecniche di crioconservazione, mediante strategie innovative di vitrificazione, di oociti di bufalo maturati in vitro.

In particolare, nell'Esperimento 1.1 sono state analizzate le percentuali di sopravvivenza post-riscaldamento e quelle di divisione e sviluppo a blastocisti, in seguito a fecondazione in vitro (IVF), di oociti di bufalo maturati in vitro e vitrificati-riscaldati, utilizzando i metodi Solid Surface Vitrification (SSV) e Cryoloop Vitrification (CLV), già precedentemente descritti per oociti ed embrioni bovini (Lane M. et al., 1999b; Dinnyés A. et al., 2000),

La caratteristica comune di questi due metodi è l'utilizzo di volumi minimi di soluzione vitrificante, in modo da ottenere alte velocità di raffreddamento e riscaldamento, e l'assenza di contenitori, che si traduce nell'incremento degli scambi termici. La riduzione del volume della soluzione vitrificante a pochi  $\mu\text{l}$ , rispetto alle tradizionali paillette, diminuisce l'incidenza di rottura degli oociti (Dinnyés A. et al., 2000), in seguito a danni della zona pellucida (ZP) durante il raffreddamento-riscaldamento. D'altra parte, i due metodi utilizzano una differente combinazione di crioprotettori (CP) durante entrambe le fasi di crioconservazione. In modo specifico, il metodo SSV prevede una

miscela costituita dal glicole etilenico (GE), un CP a basso peso molecolare ed elevata velocità di penetrazione, dal polivinilpirrolidone (PVP), un composto che incrementa la viscosità della soluzione, e dal trealosio, uno zucchero che protegge la membrana cellulare. Nel metodo CLV sono invece combinati due CP permeabili a basso peso molecolare, il GE ed il dimetilsulfossido (DMSO).

In questo primo esperimento è stato dimostrato che oociti di bufalo maturati in vitro possono essere crioconservati sia con il metodo SSV che con quello CLV. Infatti, alte percentuali di sopravvivenza sono state ottenute vitrificando gli oociti con entrambe le tecniche. È possibile comparare favorevolmente questo risultato con quello precedentemente riportato per oociti di bovino (86 %) maturati in vitro e vitrificati mediante la SSV (Dinnyés A. et al., 2000). Begin et al. (2003) hanno confrontato l'efficienza dei metodi CLV e SSV per la vitrificazione di oociti maturi di capra denudati e hanno riportato più alte percentuali di sopravvivenza con la prima metodica (89 %) rispetto alla seconda (60 %). Al contrario, nel nostro lavoro, quando sono stati utilizzati oociti denudati, le percentuali di sopravvivenza con la CLV (81 %) non differivano da quelle ottenute con la SSV (84%).

Nel suddetto esperimento è stato evidenziato che, indipendentemente dal metodo utilizzato, la vitrificazione lede la competenza allo sviluppo di oociti di bufalo maturati in vitro. Infatti, sebbene il metodo CLV abbia dato

più elevate percentuali di cleavage del metodo SSV con oociti denudati (45,4 % vs 25,9 %, rispettivamente), lo sviluppo in blastocisti si è ridotto in tutti i gruppi di vitrificazione nello stesso modo.

Nella capra sono state ottenute, dopo attivazione partenogenetica, percentuali di divisione pari al 27 % per la SSV ed al 38 % per la CLV. Tuttavia, in nessun caso sono stati prodotti embrioni di stadi avanzati (Begin I. et al., 2003). Al contrario, la vitrificazione con SSV è stata utilizzata con successo per crioconservare oociti bovini (Dinnyés A. et al., 2000), ottenendo percentuali di cleavage, in seguito a IVF, del 58 % ed una resa in blastocisti del 15 % al giorno 7.

Il nostro è il primo lavoro ad aver descritto la formazione di zigoti e di blastocisti a partire da oociti maturi di bufalo River vitrificati, in seguito a fecondazione in vitro (IVF). Successivamente la tecnica SSV è stata applicata da altri autori alla vitrificazione di oociti di bufalo Swamp maturati in vitro (Boonkusol et al., 2007), ma l'efficienza è stata valutata solo in seguito ad attivazione partenogenetica. In questo studio sono state riportate percentuali di sopravvivenza, cleavage e blastocisti pari allo 89,3 %, al 53,8 % ed al 13,6 %, rispettivamente. Tali percentuali sono del tutto sovrapponibili a quelle ottenute nel bovino con la stessa metodica (Dinnyés A. et al., 2000), in seguito ad attivazione partenogenetica. La leggera superiorità di questi risultati rispetto a quelli ottenuti nell'Esperimento 1.1 potrebbe essere imputabile all'attivazione

partenogenetica. Tale tecnica è in grado di bypassare la problematica dell'indurimento della ZP, che è noto ostacolare la penetrazione dello spermatozoo, e che si verifica in seguito al rilascio prematuro dei granuli corticali (GC) ad opera dell'abbassamento delle temperature. Inoltre, in questo lavoro, le percentuali di cleavage e di blastocisti riportate sono state calcolate sul numero di oociti sopravvissuti alla vitrificazione che mostravano l'estrusione del primo corpo polare. Ne consegue che è stata operata una selezione molto più spinta del materiale da attivare rispetto a quanto eseguito nel corso dell'Esperimento 1.1.

Recentemente la metodica SSV è stata applicata anche alla vitrificazione di oociti suini maturati in vitro, con risultati poco incoraggianti. Infatti, Somfai et al. (2006) hanno ottenuto solo il 30,6 % di sopravvivenza, il 25,7 % di cleavage valutato sui sopravvissuti dopo attivazione partenogenetica ed il 2,6 % di blastocisti calcolato sui divisi. Nel 2007 Gupta et al. (Gupta MK. et al., 2007), applicando la stessa metodica con una differente miscela di CP (GE e DMSO) e valutando le percentuali di sviluppo dopo IVF, hanno osservato valori del tutto sovrapponibili a quelli ottenuti da Somfai et al. dopo attivazione.

La tecnica CLV è stata utilizzata per vitrificare oociti di pecora (Succu S. et al., 2007) e, nonostante siano state osservate alte percentuali di vitalità post-riscaldamento (80 %), solo il 26,7 % dei sopravvissuti è andato incontro a divisione e solo il 12,5 % dei divisi si è sviluppato a blastocisti.

Risultati migliori nella percentuale di cleavage (41 %) sono stati invece ottenuti applicando la stessa metodica ad oociti di pecora maturati in vitro provenienti da individui prepuberi (Berlinguer F. et al., 2007).

È noto che nelle altre specie (Schroeder A.C. et al., 1990; Lim J.M. et al., 1992) l'efficienza della crioconservazione è più elevata per lo stadio di MII che per quello di vescicola germinale (GV). La percentuale di sopravvivenza ottenuta nell'Esperimento 1.1 in seguito a vitrificazione di oociti di bufalo maturi è paragonabile a ciò che è stato riportato per oociti di bufalo immaturi vitrificati in un precedente studio (Wani N.A., 2004), mentre i nostri valori di cleavage sono stati più elevati. Comunque, questi esperimenti hanno investigato molti differenti fattori, quindi una reale comparazione non è possibile farla.

Nell'Esperimento 1.1 è stato inoltre osservato che anche la tossicità dei crioprotettori (CP) impiegati in entrambi i metodi è un importante fattore da considerare per ottimizzare l'efficienza della vitrificazione degli oociti. Infatti, sebbene le percentuali di cleavage degli oociti sottoposti ai test di tossicità non siano state differenti tra i trattamenti rispetto al controllo, lo sviluppo in blastocisti è stato severamente ridotto dal trattamento con entrambe le soluzioni di vitrificazione e riscaldamento.

L'altro obiettivo di questo primo esperimento è stato esaminare il ruolo che giocano le cellule del cumulo durante la vitrificazione di oociti in MII nel bufalo, aspetto non ancora analizzato in questa specie. Infatti, la

rimozione delle cellule del cumulo potrebbe rappresentare uno dei fattori che contribuisce al fallimento della fertilizzazione e dello sviluppo embrionale di oociti sottoposti a vitrificazione.

È noto che la presenza di cellule del cumulo è implicata nella realizzazione di elevate percentuali di fecondazione in seguito a IVF nel bovino (Chian RC et al., 1995; Cox JF et al., 1995) e nel bufalo (Nandi S. et al., 1998). Questo aspetto è stato confermato dall'Esperimento 1.1 in cui è emerso che oociti nudi non trattati hanno dato percentuali di cleavage (34,1 %) e di sviluppo a blastocisti (5,8 %) significativamente più basse rispetto al Gruppo di controllo con le cellule del cumulo (61,6 % di cleavage e 27 % di blastocisti). D'altra parte gli studi riportati in specie differenti sull'effetto delle cellule del cumulo durante la crioconservazione degli oociti sono controversi. Whittingham (Whittingham D.G., 1977) ha osservato che la sopravvivenza di oociti di topo dopo congelamento-scongelo non varia in presenza o in assenza delle cellule del cumulo. Tale condizione è stata confermata anche per oociti umani crioconservati mediante congelamento lento (Fabbri R. et al., 2001), sebbene alcuni studiosi abbiano riportato gli effetti benefici delle cellule del cumulo sulla sopravvivenza degli oociti dopo congelamento-scongelo (Johnson M.H. e Pickering S.J., Imoedemhe D.G. e Sique A.B.; 1992; Im K. et al., 1997). Informazioni sul coinvolgimento delle cellule del cumulo nella sopravvivenza degli oociti in seguito a

vittrificazione risultano ancora poche. È stato provato che la presenza delle cellule del cumulo durante la vittrificazione protegge gli oociti immaturi di topo (Miyake T. et al., 1993). Nel bovino la presenza di pochi strati o l'assenza di cellule del cumulo intorno all'oocita durante la vittrificazione non ha influito sulle percentuali di cleavage e di sviluppo, in seguito ad attivazione partenogenetica (Dinnyés A. et al., 2000). Chian et al. (2004), invece, hanno osservato una più elevata percentuale di sopravvivenza per oociti vittrificati in assenza di cellule del cumulo rispetto a quella ottenuta in loro presenza (92.8 % vs 84 %, rispettivamente). Sebbene in entrambi i gruppi di vittrificazione non ci siano state differenze nelle percentuali di cleavage e resa in blastocisti dopo IVF, è stata ottenuta una più alta percentuale di embrioni allo stadio di 8 cellule nel gruppo nudi rispetto ai complessi cumulo oocita (COC) (37 % vs 29.3 %, rispettivamente). Si deduce che l'effetto delle cellule del cumulo sulla sopravvivenza di oociti crioconservati resta ancora da chiarire.

I nostri risultati hanno dimostrato che la presenza delle cellule del cumulo migliora la sopravvivenza in seguito a vittrificazione, indipendentemente dal metodo utilizzato. La presenza delle cellule del cumulo ha avuto, invece, un effetto differente sulle percentuali di cleavage in funzione del metodo usato. Infatti, non sono state osservate differenze nelle percentuali di cleavage tra oociti nudi e COC con la SSV, mentre la presenza di cellule del cumulo ha severamente ridotto la proporzione di

oociti che si sono divisi in seguito a vitrificazione con il metodo CLV. Comunque, indipendentemente dalla presenza/assenza delle cellule del cumulo, il metodo SSV ha dato una percentuale di cleavage più bassa di quella riportata per oociti nudi vitrificati con CLV, suggerendo che questo primo sistema di vitrificazione è più nocivo per gli oociti stessi. Nonostante ciò, la presenza/assenza di cellule del cumulo non influenza lo sviluppo a blastocisti di oociti vitrificati-riscaldati, che è stato compromesso in misura simile in tutti i gruppi di vitrificazione e, che non è risultato differente persino da quello di oociti nudi non vitrificati.

L'alta percentuale di cleavage di oociti denudati vitrificati con il CLV suggerisce che è consigliabile, per migliorare l'efficienza della vitrificazione degli oociti in questa specie, rimuovere le cellule del cumulo. D'altra parte, così facendo, lo sviluppo embrionale di oociti nudi vitrificati potrebbe essere in parte compromesso dalla mancanza delle cellule del cumulo durante la fecondazione.

Dai risultati ottenuti nell'Esperimento 1.1, si potrebbe ipotizzare che la presenza delle cellule del cumulo interferisca con la velocità di diffusione transmembranaria dei CP e, quindi, con la loro effettiva azione protettiva durante la vitrificazione. Nello studio di Fujihira et al. (Fujihira T. et al., 2005) sull'effetto di queste cellule somatiche durante la vitrificazione di oociti suini maturati in vitro, è stato osservato che, nel caso in cui vengano vitrificati oociti in presenza di cellule del cumulo, è necessario

allungare i tempi di esposizione alle soluzioni vitrificanti. Questi dati confermano l'ipotesi che le cellule del cumulo interferiscono con la normale diffusione dei CP e, di conseguenza, l'effetto tossico dovuto all'esposizione degli oociti alle sole soluzioni di vitrificazione e riscaldamento risulta ridotto. Ciò è ulteriormente dimostrato dai risultati, mostrati in Tabella 2, dei test di tossicità dell'Esperimento 1.1, dove le più basse percentuali di sopravvivenza e di sviluppo a blastocisti sono state osservate nei gruppi di oociti nudi.

Si potrebbe pensare di allungare i tempi di esposizione ai CP in presenza delle cellule del cumulo, ma è stato dimostrato che queste risentono delle basse temperature, riportando danni a livello delle gap-junction (Bugliolo L. et al., 2007).

Nel corso dell'Esperimento 1.1 è stata dimostrata una superiorità del metodo CLV rispetto a quello SSV, indicata dalle più elevate percentuali di cleavage raggiunte. Inoltre un altro aspetto da tener presente nel confronto tra queste due metodiche riguarda la percentuale di recupero che è stata inferiore con il metodo SSV rispetto a quello CLV (dati personali), a causa di difficoltà tecniche. Infatti, è possibile perdere alcuni oociti durante la SSV perché tendono ad attaccarsi alla pipetta a bocca o perché si può verificare una dispersione della goccia sulla superficie metallica. D'altra parte il metodo CLV permette la visualizzazione degli oociti durante la procedura e prevede semplici sistemi sia di

raffreddamento che di riscaldamento, poiché il loop viene immerso direttamente nell'azoto liquido (LN<sub>2</sub>) o nella soluzione di riscaldamento.

Nell'Esperimento 1.1 le metodiche sono state comparate nel loro insieme, ovvero utilizzando le specifiche soluzioni di CP ed i tempi di esposizione descritti dai rispettivi ideatori (Dinnyés A. et al., 2000; Lane M. et al., 1999). Ne consegue l'impossibilità di stabilire se il miglioramento della percentuale di cleavage sia attribuibile allo strumento CLV o alle diverse soluzioni impiegate durante la vitrificazione.

Pertanto si è ritenuto interessante, nell'Esperimento 1.2, procedere ad un confronto diretto tra la procedura impiegata con il metodo SSV (CP1) e quello del metodo CLV (CP2), utilizzando come unico strumento il cryoloop. Inoltre, essendo stato dimostrato un effetto negativo delle cellule del cumulo sull'efficienza di vitrificazione, da questo momento, sono stati vitrificati solo oociti denudati.

La comparazione tra le due procedure ha evidenziato un miglioramento significativo del cleavage nel Gruppo CP2 (42,5 %) rispetto al Gruppo CP1 (21,6 %), mentre le percentuali di sopravvivenza e di blastocisti sono risultate simili (Tabella 3). Dall'Esperimento 1.2 è emerso che la combinazione di GE e DMSO, come crioprotettori nelle soluzioni di vitrificazione, e di saccarosio, in quelle di riscaldamento, migliora l'efficienza della vitrificazione di oociti di bufalo maturati in vitro e sottoposti ad IVF.

Già precedentemente molti studi avevano provato l'efficacia del GE come CP nella vitrificazione di embrioni ed oociti (Kasai M. et al., 1990; Rayos et al., 1994; Dhali et al., 2000). Il GE è stato usato per la prima volta da Miyamoto ed Ishibashi nel 1977; il suo basso peso molecolare spiega la sua alta permeabilità e, conseguentemente, la sua maggiore versatilità di utilizzo (Bracke C. e Niemann H., 1995). È stato però nel 1999 che, grazie ad uno studio di Sommerfield e Niemann (Sommerfield V. and Niemann H., 1999) è stata dimostrata la bassa tossicità del GE testandolo a partire da concentrazioni di 1.8 M fino a 8.9 M. Grazie a queste caratteristiche, il GE rappresenta il CP più largamente usato.

Componenti addizionali permeabili come glicole propilenico, acetamide, glicerolo, raffinoso e DMSO sono stati testati in varie combinazioni (dela Pena EC. et al., 2001; Kasai M. e Mukaida T. 2004), e quella GE-DMSO è sembrata la 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 CP non permeabili, come i mono- ed i disaccaridi, il saccarosio, il trealosio, il glucosio ed il galattosio sono quelli più utilizzati (Ali J. e Shelton JN1993; Kasai M. 1997; Wright DL. et al., 2004). Recentemente, così come il GE, anche il saccarosio è diventato quasi un componente standard nelle soluzioni di vitrificazione.

Pertanto, nell'Esperimento 2, per valutare l'efficienza del metodo Cryotop Vitrification (CTV) su oociti di bufalo, si è deciso di testare sia differenti concentrazioni di GE e DMSO nelle soluzioni di vitrificazione che differenti concentrazioni di saccarosio in quelle di riscaldamento.

Il cryotop (Kuwayama e Kato, 2000) è uno degli strumenti di crioconservazione più recenti che sfruttano il principio dei volumi minimi di soluzione di vitrificazione. Tale strumento, riducendo il volume della soluzione di vitrificazione contenente il campione a meno di 0.1 $\mu$ l, ha permesso di aumentare ulteriormente le velocità di raffreddamento e quelle di riscaldamento, portandole a valori, rispettivamente, di 22800 °C/min e di riscaldamento a 42100 °C/min (Kuwayama et al., 2005a).

Dai risultati ottenuti è emerso che il metodo CTV rappresenta una valida procedura di vitrificazione per gli oociti di questa specie, utilizzando le concentrazioni più elevate di GE e DMSO durante la vitrificazione ed una fase di riscaldamento multistep a partire da concentrazioni maggiori di saccarosio (Gruppo 2). Infatti, il Gruppo 2 ha presentato un'elevata percentuale di sopravvivenza sia post-riscaldamento (92,8 %) che dopo 24 ore di coltura (85,6 %) ed è risultato essere l'unico gruppo di vitrificazione in cui non è stato osservato un peggioramento della sopravvivenza dal giorno 0 al giorno 1 di coltura. La percentuale di cleavage, valutata sui sopravvissuti al giorno 0, è stata significativamente differente dal controllo solo al 5 %; al contrario tale valore è risultato

differire in modo altamente significativo ( $P < 0.01$ ) in tutti gli altri gruppi di vitrificazione rispetto al controllo. Questo andamento è stato maggiormente confermato quando la percentuale è stata valutata sui sopravvissuti a 24 h di coltura, che nel Gruppo 2 è risultata sovrapponibile al controllo. L'importanza di questo risultato è dovuta al fatto che nel Gruppo 2 non si è osservato un decremento della sopravvivenza a 24 h. Percentuali di cleavage, sui sopravvissuti a 24 h, simili al controllo sono state osservate anche nel Gruppo 4, che aveva dato, invece, una peggiore efficienza. Questo dato, però, è giustificato dal netto decremento della sopravvivenza osservata a 24 h rispetto al giorno 0.

Anche nell'Esperimento 2, però, non è stato osservato un miglioramento della resa in blastocisti in tutti i gruppi vitrificati rispetto al Gruppo freschi. L'insieme di questi risultati indica una migliore efficienza di questo metodo, con le condizioni del Gruppo 2, rispetto a quelli ottenuti nell'Esperimento 1.1.

La valutazione dell'effetto di differenti concentrazioni di CP durante la vitrificazione era stata precedentemente valutata da Vajta per oociti bovini maturati in vitro e crioconservati mediante Open Pulled Straw. In tale lavoro non sono state riportate differenze tra i gruppi trattati con diverse concentrazioni di GE e DMSO, e sono stati ottenuti risultati sovrapponibili a quelli del Gruppo 2 dell'Esperimento 2.

Dalla sua ideazione ad oggi diversi autori hanno usato la CTV per vitrificare oociti di diverse specie. Nel 2005, Kuwayama et al. (Kuwayama M. et al., 2005a) hanno vitrificato con successo oociti bovini parzialmente denudati, ottenendo percentuali di vitalità pari al 96,7 %, valori di cleavage del 59,5 % ed una resa in blastocisti del 22,9 %. Questi valori, pur differenti dal Gruppo controllo, sono più elevati rispetto a quelli che abbiamo riscontrato nel bufalo. Nel 2007 Succu et al. (Succu S. et al., 2007) hanno vitrificato oociti maturi di pecora mediante CTV, utilizzando soluzioni di vitrificazione e riscaldamento simili a quelle da noi utilizzate nel Gruppo 2. Sono state osservate percentuali di cleavage pari al 42,86 % ma non sono state prodotte blastocisti. Nel 2005 Fujihira et al. (Fujihira et al., 2005) hanno vitrificato oociti maturi di maiale riportando risultati superiori a quelli precedentemente pubblicati. In questo studio sebbene le percentuali di sopravvivenza non siano state elevate (66,4 %), si sono comunque ottenute percentuali di cleavage sovrapponibili al controllo (53,4 %) e di blastocisti pari all'8,2 %. È comunque da evidenziare che la migliore efficienza è attribuibile anche alla tecnica di iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) utilizzata per la fecondazione, in grado di bypassare il problema dell'indurimento della ZP a cui gli oociti vanno incontro per il rilascio prematuro dei granuli corticali (GC) in seguito a vitrificazione. L'impiego del metodo CTV per vitrificare oociti di bufalo è limitato ad un unico lavoro (Muenthaisong S. et al.,

2007), pubblicato solo successivamente alla pianificazione di questo esperimento. Muenthaisong et al. hanno vitrificato oociti maturi di bufalo Swamp e hanno valutato l'efficienza di tale metodica in seguito ad attivazione partenogenetica. Sono state ottenute percentuali di sopravvivenza inferiori a quelle riportate dal Gruppo 2 dell'Esperimento 2 (67,7 % vs 92,8 %, rispettivamente), mentre valori più elevati di cleavage sono stati osservati dal gruppo thailandese (76 % vs 55,3 %). Il più elevato valore di cleavage è giustificabile dall'utilizzo dell'attivazione partenogenetica piuttosto che dell'IVF. In questo studio sono stati attivati solo gli oociti presentanti il 1° corpo polare, quindi in MII; inoltre, ricorrendo all'attivazione, è stato superato il problema dell'indurimento della ZP e quello dell'assenza delle cellule del cumulo, necessarie per la fecondazione.

I risultati dei precedenti esperimenti suggeriscono che, dei vari metodi testati, il CTV, con le concentrazioni più elevate di GE e DMSO durante la vitrificazione e con una fase di riscaldamento multistep, ha determinato un significativo incremento dell'efficienza, perlomeno in termini di cleavage. Per tale ragione si è ritenuto che tale procedura sia la più idonea alla crioconservazione degli oociti di bufalo e che altri aspetti vadano investigati per ottimizzare l'efficienza. Nel corso del primo esperimento, è emerso che è preferibile denudare gli oociti prima della vitrificazione, come indicato dai peggiori risultati ottenuti vitrificando i

COC. D'altra parte, sempre nell'Esperimento 1.1, è stato dimostrato che le cellule del cumulo hanno un'importanza fondamentale ai fini del processo di fecondazione e per lo sviluppo embrionale successivo; infatti un significativo decremento delle percentuali sia di cleavage che di blastocisti è stato osservato semplicemente rimuovendo le cellule del cumulo prima della IVF in oociti freschi, cioè non sottoposti a procedure di vitrificazione. Una parziale riduzione degli strati di cellule del cumulo che circondano l'oocita prima della vitrificazione potrebbe rappresentare la soluzione a tale problema, ma la maggiore lassità delle giunzioni tra oocita e cellule del cumulo nel bufalo (Gasparrini B., 2002) rende tale operazione, facilmente eseguibile nel caso degli oociti bovini, difficoltosa da praticare. Si è quindi avuta la necessità di individuare strategie alternative in questa specie, come il verificare l'efficienza di un supporto somatico durante la fecondazione in vitro di oociti di bufalo vitrificati senza cellule del cumulo, utilizzando il metodo CTV con la combinazione di CP del Gruppo 2 dell'Esperimento 2.

Diversi studi sono stati condotti per chiarire lo specifico ruolo delle cellule del cumulo nel processo di fecondazione, usando sistemi di coltura dove oociti denudati sono stati messi in co-coltura con cellule del cumulo isolate, sotto forma di sospensione o monostrato, o in presenza di medium condizionato (Hashimoto et al., 1998; Ikeda et al., 2000; Tanghe et al., 2003). Si è, tuttavia, osservato che questi approcci hanno un effetto

limitato sull'acquisizione della competenza allo sviluppo dell'ocita (Geshi et al., 2000).

Luciano et al. (2005) hanno analizzato le interazioni tra le cellule somatiche ed i gameti femminili usando un sistema di coltura dove cellule del cumulo sono state aggiunte come COC intatti in co-coltura con oociti nudi. Da tale esperimento è emerso che la presenza di COC in co-coltura, durante l'IVF, migliora le percentuali di blastocisti (22,7 %) rispetto al gruppo di oociti denudati (8,6 %). Ciò mette in evidenza che l'aggiunta di COC intatti, sia durante l'IVM che l'IVF di oociti denudati, può ripristinare completamente la capacità di sviluppo degli oociti. In modo simile ad altri studi (Hashimoto et al., 1998; Ikeda et al., 2000; Geshi et al., 2000), anche in questo lavoro, come del resto anche nel bufalo (Esperimento 1.1), solo una limitata porzione di oociti privati delle cellule del cumulo era in grado di arrivare alle stadio di blastocisti dopo fecondazione.

I risultati dell'Esperimento 3 hanno dimostrato come l'aggiunta di COC bovini in co-coltura migliori l'efficienza della vitrificazione, mediante CTV, di oociti nudi di bufalo maturati in vitro, mentre la presenza di cellule del cumulo in sospensione o in monostrato è stata ininfluyente. È stata osservata, nel gruppo di co-coltura (Gruppo D), una sopravvivenza degli oociti simile al Gruppo controllo (92,7 % vs 97, 5 %) e maggiore rispetto agli altri gruppi di vitrificati. Inoltre la percentuale di divisione, pari al 60,9

%, del Gruppo D è stata del tutto sovrapponibile a quella degli oociti freschi. È ipotizzabile che i risultati ottenuti siano dovuti alla preservazione dell'interazione fisiologica tra gli oociti e le cellule del cumulo nei COC intatti, che possono aver esercitato un effetto più benefico sugli oociti nudi. Infatti, era stato già precedentemente dimostrato, nella specie bovina, che cellule del cumulo o della granulosa disaggregate vanno rapidamente incontro ad apoptosi durante la coltura in vitro (Luciano et al., 2000). Sebbene sia stato osservato un aumento della percentuale di divisione, la resa embrionale è rimasta comunque bassa e significativamente differente dal controllo in tutti i gruppi vitrificati, indipendentemente dal trattamento. Si presuppone, quindi, che gli oociti subiscano danni strutturali che impediscano il corretto sviluppo ad embrioni degli oociti fecondati.

Diversi autori hanno descritto che nei protocolli di successo per la crioconservazione di oociti di mammifero è necessario preservare l'integrità del fuso meiotico quando questi sono esposti alle basse temperature (Eroglu A. et al., 1998). È stato osservato, in oociti bovini (Saunders K and Parks J.E., 1999; Aman R.R. and Parks J.E., 1994) ed umani (Almeida P.A. and Bolton V.N., 1995), che fluttuazioni della temperatura colpiscono direttamente l'organizzazione del citoscheletro e dei cromosomi. La conseguenza principale del raffreddamento è rappresentata dalla depolimerizzazione e dalla scomparsa dei centri di

organizzazione dei microtubuli (Webb M. et al., 1986). Il raffreddamento comporta il disassemblaggio delle fibre del fuso in pochi minuti, seguito da un eguale rapido riassetto del fuso stesso dopo il ritorno a temperature normali (Inoue S., 1981). Magistrini e Szollosi (Magistrini M. e Szollosi D., 1980) hanno riportato che il fuso meiotico di oociti di topo è sensibile al freddo, mostrando una completa disorganizzazione dopo 45-60 minuti a 0 °C. Tuttavia, gli effetti del freddo sul fuso sembrano essere reversibili, osservandosi il ripristino di una normale organizzazione dello stesso dopo riscaldamento. Pickering et al. (Pickering S.J. et al., 1990) hanno scoperto che l'esposizione degli oociti umani a temperatura ambiente per 30 minuti determina il disassemblaggio completo del fuso, associato a dispersione cromosomica nel 60 % degli oociti. Questo effetto appare essere reversibile solo nel 25-50 % degli oociti. È stato visto in oociti bovini maturati in vitro che il fuso meiotico inizia a disassemblarsi dopo 10-20 minuti di permanenza a 4 °C (Richardson R.R. e Parks J.E., 1992). Nel maiale è stato riportato che dopo 5 minuti a 4 °C, i microtubuli del fuso della maggior parte degli oociti sono parzialmente o completamente disassemblati (Liu R. H. et al., 2003).

È stato possibile osservare in oociti di topo (Aigner S. et al., 1992) e di bovino (Aman R. R. e Parks J. F., 1994) che le anomalie del fuso, descritte dopo congelamento lento e scongelamento rapido, sono reversibili e che lo stesso riacquista la sua normale conformazione dopo

un periodo di incubazione. È stato riportato che, nel contesto del congelamento lento, una pre-incubazione di 2 h è richiesta per gli oociti prima dell'inseminazione per migliorare il loro sviluppo embrionale (Im K. et al., 1997; Lim JM. et al., 1992; Asada M. e Fukui Y., 2000). Recentemente Saunders e Parks (Saunders K. e Parks J.E., 1999) hanno osservato che spesso, dopo 3 ore di pre-incubazione, non è possibile osservare una struttura normale in oociti bovini trattati con congelamento lento e scongelamento rapido. È stato visto che i cambiamenti morfologici del fuso dopo la vitrificazione sono strettamente legati a effetti funzionali sulla fecondazione e sullo sviluppo (O'Neil et al., 1997; Eroglu et al., 1998).

Nell'Esperimento 4 è stato, quindi, effettuato uno studio preliminare sui danni subiti dall'oocita a livello del materiale cromosomico e del fuso meiotico, in seguito a vitrificazione. Poiché è prassi comune far riposare gli oociti per 2 h dopo il riscaldamento prima di sottoporli a fecondazione, si è ritenuto opportuno studiare gli oociti vitrificati con CTV a 0 e 2 h post-riscaldamento, confrontandoli con un Gruppo di controllo non sottoposto alla crioconservazione.

È stato osservato che, sia al momento del riscaldamento che dopo 2 h di riposo, la percentuale di oociti con una MII normale si è significativamente ridotta ( $P < 0.01$ ) rispetto al Gruppo controllo (Tabella 4). Un danno da freddo evidente è rappresentato dalla riduzione delle dimensioni del fuso

meiotico con conseguente coartazione della piastra metafisica in entrambi i gruppi trattati.

Al contrario di quello che si è verificato in altre specie, dopo 2 h di incubazione gli oociti vitrificati hanno presentato una più elevata percentuale di anomalie del fuso, con conseguente dispersione cromosomica (metafase frammentata).

Simile andamento, sebbene con percentuali di anomalie maggiori, è stato ottenuto in seguito a vitrificazione di oociti di pecore prepuberi maturati in vitro (Bogliolo L. et al., 2007), in uno studio in cui sono stati valutati gli effetti della procedura di vitrificazione, sulla configurazione del fuso e dei cromosomi, dopo riscaldamento e dopo 2 h di incubazione.

È ipotizzabile che il riposo post-riscaldamento abbia messo in evidenza danni già presenti, ma che per la rapida tempistica di fissazione post-riscaldamento non abbiano avuto il tempo di manifestarsi. Di conseguenza, è possibile affermare che la pre-incubazione di 2 h prima di eseguire la fecondazione potrebbe non essere necessaria nella specie bufalina. È pur vero che la diretta influenza di questo fattore sulla divisione post-IVF e sulla formazione di blastocisti non è stata verificata nel presente studio. Chian et al. nel 2004 hanno valutato l'effetto del tempo di pre-incubazione dopo riscaldamento prima dell'IVF su oociti bovini vitrificati mediante il CTV. In questo lavoro non sono state osservate differenze significative sia per i valori di divisione che per quelli

di blastocisti dopo 0 e 2 h post-riscaldamento, suggerendo che non è necessaria la pre-incubazione per oociti di questa specie.

## **4 CONCLUSIONI**

L'importanza di questo studio risiede nell'aver riportato, per la prima volta, la produzione di blastocisti a partire da oociti maturi di bufalo vitrificati-riscaldati dopo fecondazione in vitro. Questo dato è particolarmente incoraggiante in considerazione del fatto che gli oociti di bufalo, analogamente agli embrioni, sono molto sensibili alle procedure di crioconservazione, dato l'alto contenuto intracitoplasmatico di lipidi. Nel corso del presente lavoro sono state approfondite le conoscenze sulla crioconservazione degli oociti della specie bufalina. E' stato, innanzitutto osservato che è preferibile rimuovere le cellule del cumulo prima di sottoporre gli oociti alle procedure di vitrificazione. E' stata, inoltre, dimostrata l'efficacia di diverse metodiche di vitrificazione che sfruttano l'utilizzo di volumi minimi, quali la SSV, la CLV e la CTV. Un sensibile miglioramento della sopravvivenza e della percentuale di cleavage è stato ottenuto con il metodo CTV, utilizzando concentrazioni relativamente elevate di GE e DMSO durante la vitrificazione ed un riscaldamento in più step. Un altro risultato importante del presente lavoro, ottenuto con il CTV, eseguendo la IVF in co-coltura con COC bovini, è stato il sensibile incremento della percentuale di cleavage che ha raggiunto livelli comparabili a quelli riportati in media per gli oociti freschi. Ciononostante, la percentuale di embrioni che riescono a raggiungere lo stadio di blastocisti non è migliorata neanche ricorrendo a questo espediente. Sarebbe interessante verificare se il supporto somatico esteso anche alla fase di coltura possa in qualche modo incrementare la resa embrionale. D'altra parte, l'alterato sviluppo embrionale potrebbe derivare da danni ultrastrutturali, determinati dall'insulto termico e/o dalla tossicità dei CP, che, pur non inficiando l'espletamento del processo di fecondazione, esercitano un effetto inibente sullo sviluppo tardivo. Le alterazioni del fuso meiotico e della piastra metafasica, evidenziate in questo studio, potrebbero, infatti, risultare associate ad un'alta incidenza di aneuploidie.

L'insieme dei risultati descritti incoraggia a perseverare nelle ricerche finalizzate all'ottimizzazione dei metodi di crioconservazione degli oociti in questa specie. Allo scopo di ridurre i danni a carico del citoscheletro sarebbe interessante osservare gli effetti del pretrattamento degli oociti con alcuni agenti stabilizzanti il citoscheletro stesso, quali la citocalasina B e il taxolo.

Infine, studi futuri sono necessari per capire i meccanismi mediante i quali le procedure di crioconservazione agiscono su alcune molecole chiave coinvolte nel controllo del ciclo cellulare. Infatti, danni come aneuploidie, attivazione partenogenetica, riduzione post fertilizzazione delle percentuali di cleavage, arresto dello sviluppo a stadi precompatti e bassa produzione di blastocisti potrebbero essere dovuti ad alterazioni delle funzioni di proteine fondamentali coinvolte negli stadi precoci di sviluppo, suggerendo l'importanza dei fattori citoplasmatici nel determinare il destino degli oociti vitrificati.

## **5 BIBLIOGRAFIA**

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;

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; 61(1): 57-66;

Agca Y., Lui J., Crister E. S., McGrath J. J., and Crister J. K. *Temperature-dependent osmotic behaviour of germinal vesicle and metaphase II stage bovine oocytes in the presence of Me2SO in relationship to cryobiology.* Mol. Reprod. Dev., 1999; 53, 59-67;

Agca Y., Liu J., Rutledge J. J., Crister E. S. and Crister J. K. *Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation.* Mol. Reprod. Dev., 2000; 55: 212-219;

Agca Y. *Cryopreservation of oocytes and ovarian tissue.* ILAR J., 2000; 41: 207-220;

- Agca Y., J. Gilmore, M. Byers, E.J. Woods, J. Liu, J.K. Critser, *Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars*. Biol. Reprod., 2002; 67: 1493-1501;
- Aigner S., Van der Elst J., Siebzehrubl E., Wildt L., Lang N., Van Steirteghem AC. *The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte*. Hum Reprod, 1992; 7: 857-864;
- Al Hasani S., Diedrich K., Van der Ven H., Reinecke A., Hartje M. and Krebs D. *Cryopreservation of human oocytes*. Hum. Reprod., 1987; 2: 695-700;
- Al Hasani S., Kirsh J., Diedrich K., Blanke S., VanDerVen H. and Krebs D. *Successful embryo transfer of cryopreserved and in vitro fertilized rabbit oocytes.*, Human. Reprod., 1989; 4: 77-79;
- Albarracin J. L., Morato R., Izquierdo D., and Mogas T. *Vitrification of calf oocytes: effects of maturation stage and prematuration treatment on the nuclear and cytoskeletal components of oocytes and their subsequent development.*, Mol. Reprod. Dev., 2005; 72: 239-249;

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

Almeida P.A. and Bolton V.N. *The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocytes.* Zigote, 1995; 3: 357-365;

Aman R. R. and Parks J. F. *Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes.*, Biol. Reprod., 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., Pearl M., and Zeron Y. *Does membrane lipid profile explain chilling sensitivity and membrane lipid phase transition of spermatozoa and oocytes?*, Cryo Letters, 2000; 21: 179-186;

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., Fukui Y. *Effect on fertilization and development by re-culture after freezing and thawing of bovine oocytes matured in vitro.*

Theriogenology, 2000; 54: 889-898;

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;

Avarbock M.R., C.J. Brinster, R.L. Brinster, *Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells.* Nat. Med.,

1996; 2: 693-696.

Bahadur G., R. Chatterjee, D. Ralph. *Testicular tissue cryopreservation in boys, ethical and legal issues.* Hum. Reprod., 2000; 15: 1416-1420.

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;

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;

- Barnes FL., Damiani P., Looney CR. and Duby RT. *The meiotic stage affects subsequent development of cooled bovine oocytes.* Theriogenology, 1997; 47: 183;
- 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;
- Baumber J., Ball B. A., and Linfor J. J. *Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants.* Am. J. Vet. Res., 2005; 66: 772–779;
- Baust JG. *Biochemical correlates to cold hardening in insects.* Cryobiology, 1981; 27: 401-415;
- Begin I., Bhatia B., Baldassarre H., Dinnyés A. and Keefer CL. *Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods.* Theriogenology, 2003; 59: 1839-1850;

Berlinguer F., Succu S., Massa F., Madeddu M., Bebbere D., Leoni G.G., Naitana S. *Effect of trehalose co-incubation on in vitro matured prepubertal ovine oocyte vitrification*. *Cryobiology*, 2007; in press;

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;

Bogliolo L, Ariu F, Rosati I, Zedda MT, Pau S, Naitana S, et al. *Vitrification of immature and in vitro matured horse oocytes*. *Reprod Fertil Dev*, 2006;18: 149-150;

Bogliolo L., Ariu F., Fois S., Rosati I., Zedda MT., Leoni G., Succu S., Pau S., Ledda S. *Morphological and biochemical analysis of immature*

*ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells*. Theriogenology, 2007; in press;

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

Boonkusol D., Gal A. B., Bodo S., Gorchony B., Kitiyanant Y., and Dinnyes,A. *Gene expression profiles and in vitro development*

*following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos.*

Mol. Reprod. Dev., 2006; 73: 700-708;

Boonkusol D., Faisaikarm T., Dinnyes A. and Kitiyanant Y. *Effects of vitrification procedures on subsequent development and ultrastructure of in vitro-matured swamp buffalo (Bubalus bubalis) oocytes.*

Reproduction, Fertility and Development, 2007; 19: 383-391;

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;

Byrd W. *Cryopreservation, thawing and transfer of human embryos.*

Semin. Reprod. Med., 2002; 20: 37-43;

Caracciolo di Brienza V, Squires EL, Zicarelli L, Carnevale EM. *Establishment of pregnancies after vitrification of equine embryos.*

Reprod Fertil Dev, 2004; 16: 165;

Carroll J., Warnes GM. and Matthews CD. *Increase in digyny explains polyploidy after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes.*

J. Reprod. Fertil., 1989; 85: 489-494;

Carroll J., Wood MJ. and Whittingham DG. *Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes. Protective action of certain macromolecules.* J. Reprod. Fertil., 1990; 90: 547-553;

Carroll J., Wood DM, Whittingham DG. *Normal development of frozen-thawed mouse oocytes: Protective action of certain macromolecules.*

Biol Reprod, 1993; 48: 606-612;

Chen C. *Pregnancy after human oocyte cryopreservation.* Lancet., 1986; 1: 884-886;

Chen S. U., Lien Y. L., Chao K. H., Lu H. F., Ho H. N., and Yang Y. S. *Open pulled straws for vitrification of matured mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straw.* Hum. Reprod., 2000; 16: 2350-2356;

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;*

Chen S. U., Lien Y. R., Chao H. N., Ho Y. S., Yang T.Y., and Lee T.Y. *Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing. A review article. Mol. Cell. Endocrinol., 2003; 202: 101-107;*

Chian RC, Okuda K, Niwa K. *Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes. Anim Reprod Sci, 1995; 38: 37-48;*

Chian C. M., Chan W. B., Quah E., and Cheng L. C. *Triploid pregnancy after ICSI of frozen testicular spermatozoa into cryopreserved human oocytes: case report. Hum. Reprod., 2000; 15: 1962-1964;*

Chian R-C, Kuwayama M, Tan L, Kato O, Nagai T. *High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. J Reprod Dev, 2004; 50: 685-96;*

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;

Cobo, A., Rubio, C., Gerli, S., Ruiz, A., Pellicar, A., and Remohi, J. *Use of fluorescence hybridation to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes*. Fertil. Steril., 2001; 75: 354-360;

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;

Cooper A., Paynter SJ., Fuller BJ. and Shaw RW. *Differenzial effects of cryopreservation on nuclear or cytoplasmic maturation in vitro in immature mouse oocytes from stimulated ovaries*. Hum. Reprod., 1998; 13: 971-978;

Coticchio G., Sereni E., Serrao L., Mazzone S., Idarola I., and Borini A.

*What criteria for the definition of oocyte quality?* Ann. N.Y. Acad. Sci., 2004; 1034: 132–144;

Coticchio G. *Criteria to assess human oocyte quality after*

*cryopreservation.* Reprod. Biomed. Online, 2005; 11: 421-427;

Cox JF, Hormazabal J, Santa Maria A. *Effect of cumulus on in vitro*

*fertilization of bovine matured oocytes.* Theriogenology, 1995; 40: 1259-1267;

Crabbe E., G. Verheyen, H. Tournaye, A. Van Steirteghem. *Freezing of*

*testicular tissue as a minced suspension preserves sperm quality*

*better than whole-biopsy freezing when glycerol is used as*

*cryoprotectant.* Int. J. Androl., 1999; 22: 43-48;

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;

De Rosa A., Attanasio L., Boccia L., Monaco E., Vecchio D., Gasparri B. *Vitrificazione di embrioni di bufalo (Bubalus bubalis) mediante il metodo delle Open Pulled Straw (OPS) : effetto dello stadio di sviluppo*. Atti del 3° Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, 2005; 266;

De Rosa A., Attanasio L., Boccia L., Pellerano G., Campanile G., Gasparri B. *Cryotop vitrification for in vitro produced buffalo (Bubalus bubalis) embryos*. Reproduction, Fertility and Development 2007: 174;

Deanesly R. *Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing*. J. Endocrinol, 1954 ; 11: 197-200;

Deansley R.H. *Cyclic finction in ovarian g&s*. J Endocrinol, 1956; 13: 211-220;

Deb K., Sivaguru M., Yong H. Y., and Roberts R. M. *Cdx2 gene expression and trophoctoderm lineage specification in mouse embryos*. Science, 2006; 311: 992-996;

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 durino post-compaction development*. Reprod Fretil Dev, 2006; 18(5): 597-607;

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 glicol or raffinose on oocyte viabilità*. Cryobiology, 2001; 42: 103-111;

Dhali A., Manik RS., Das SK., Singla SK. and Palta P. *Vitrification of buffalo (Bubalus Bubalis) oocytes*. Theriogenology, 2000; 53: 1295-1303;

- Didion BA., Pomp D., Martin MJ., Homanics GE. and Markert CL. *Observations of the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage.* J. Anim. Sci., 1990; 68: 2803-2810;
- Diez C., Duque P., Gómez E., Hidalgo C. O., Tamargo C., et al. *Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability.* Theriogenology, 2005; 64: 317-333;
- Dinnyés A., Dai Y., Jiang S. and Yang X. *High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer.* Biol. Reprod., 2000; 63: 513-518;
- Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, Costa ME, Gjeda SR. *Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropindependent increase in angiogenic factor gene expression.* Endocrinology, 1994; 134: 1146-1154;
- 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;

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

Downs SM., Schroder AC. and Eppig JJ. *Serum maintains the freezability of mouse oocytes matured in vitro by preventing hardening of the zona pellucida*. Gamete Res., 1986; 15: 115-122;

DuFrain RJ. *The effects of ionizing radiation on preimplantation mouse embryos developing in vitro*. In, Muhlbock, O (Ed). *Basic aspects of freeze preservation of mouse strains*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart., 1976; 73-84;

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;

Edashige K., Yanaji Y., Kleinhans F. W., and Kasai M. *Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation*. Biol. Reprod., 2003; 68: 87-94;

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;

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

Eppig JJ. *Growth and development of mammalian oocytes in vitro*. Arch Pat Lab Med, 1992; 116: 379-382;

Eroglu A., Toth TL, Toner M. *Alteration of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes*. Fertil Steril, 1998; 69: 944-957;

Eroglu A., Toner M., and Toth T. L. *Beneficial effect of microinjected trehalose on cryosurvival of human oocytes*. Fertil. Steril., 2002; 77: 152-158;

Eroglu A., Lawitts J. A., Toner M., and Thomas L. T. *Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development*. Cryobiology, 2003; 46: 121-134;

Fabbri R., Porcu E., Marsella T., Rochetta G., Venturosi S., and Flamini C. *Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival*. Hum. Reprod., 2001; 16: 411-416;

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;

Fuchinoue K., Funkunaga N., Chiba C., Nakajo Y., Yagi A., and Kyono K. *Freezing of human immature oocytes using cryoloops with taxol in the vitrification solution*. J. Assist. Reprod. Genet., 2004; 21: 307-309;

Fujihira T., Nagai H., and Fukui Y. *Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of taxol treatment for vitrification of in vitro matured porcine oocytes.* Cryobiology, 2005; 51: 339-343;

Fuku E., Kojima T., Shioya Y., Marcus GJ. and Downey BR. *In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes.* Cryobiology, 1992; 29: 485-492;

Fuku E., Xia L., Downey B.R. *Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification.* Cryobiology, 1995; 32(2): 139-156;

Fuller B. J. *Gene expression in response to low temperature in mammalian cells: a review of current ideas.* Cryo Letters, 2003; 24: 95-102;

Gadea J., Garcia-Vasquez F., Matas C., Pardon J. C., Canovas S., and Gumbao D. *Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function.* J. Androl., 2005; 26: 396-404;

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

Gasparri 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;

Gasparri 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;

Gasparri B., Savoud H., Neglia G., Matos DG., Donnay I. et al. *Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (Bubalus bubalis) oocytes: effects of cysteamine on embryo development*. Theriogenology, 2003; 60: 943-952;

Geshi M, Takenouchi N, Yamauchi N, Nagai T. *Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells*. Biol Reprod, 2000; 63: 1730–1734

Ghetler Y., Skutelsky B., Ben Nun I., Bendor L., Anihai D., and Shalgi R.

*Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules.*

Fertil. Steril., 2006; 86: 210-216;

Gilchrist R. B., Ritter L. J., and Armstrong D. T. *Oocyte-somatic cell*

*interaction during follicle development in mammals.* Anim. Reprod.

Sci., 2004; 82–83, 431–446;

Gilmore J.A., J. Liu, D.Y. Gao, J.K. Critser. *Determination of optimal*

*cryoprotectants and procedures for their addition and removal from*

*human spermatozoa.* Hum. Reprod., 1997; 12: 112-118;

Glenister PH., Wood MJ., Kirby C. and Whittingham DG. *Incidence of*

*chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained*

*from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro.* Gamete Res., 1987;

16: 205-216;

Gook DA, Osborn M, Johnston WIH. *Cryopreservation of mouse and*

*human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the*

*meiotic spindle.* Hum Reprod, 1993; 8: 1101-1109;

Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R. *Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice*. J Reprod Fertil, 1994a; 101: 619-623;

Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. *Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C*. Hum Reprod, 1994b; 9: 597-603;

Graham JK. *Cryopreservation of stallion spermatozoa*. Vet. Clin. North. Am. Equine Pract., 1996; 12: 131-147;

Guanasena KT, Lakey JRT, Villines PM, Crister ES, Crister JK. *Allogenic and xenogenic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice*. Biol Reprod, 1997a; 57: 226-231;

Guanasena KT, Villines PM, Crister ES, Crister JK. *Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries*. Hum Reprod, 1997b; 12: 101-106;

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

Gupta MK., Uhm SJ., Lee HT. *Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification*. Theriogenology, 2007; 67: 238-248;

Hamano S., Koikeda A., Kuwayama M. and Nagai T. *Full-term development of in vitro-matured and fertilized bovine oocytes*. Theriogenology, 1992; 38: 1085-1090;

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;

Hammitt D.G., Syrop C.H., Walzer D.L., Bennett M.R. *Conditions of oocyte storage and use of noninseminated as compared with inseminated, nonfertilized oocytes for the hemizona assay*. Fertil Steril, 1993; 60(1): 131-136;

Hara K., Abe Y., Kumada N., Aono N., Kobayashi J., Matsumoto H., Sasada H., and Sato E. *Extrusion and removal of lipid from*

*cytoplasm of porcine oocytes at germinal vesicle stage: centrifugation under hypertonic conditions influences vitrification.* Cryobiology, 2005; 50: 216-222;

Hashimoto S, Saeki K, Nagao Y, Minami N, Yamada M, Utsumi K. 1998. *Effects of cumulus cell density during in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes.* Theriogenology; 49: 1451–1463;

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;

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;

Hinsch K.D., Hinsch E., Pfisterer S., Schill W.B., Gibbons W.E., Hodgen G.D. et al. *Anti-ZP3 antibodies binding to the human zona pellucida: effect of oocyte-storage conditions*. Am J Reprod Immunol Copenhagen, 1994; 32(3): 146-151;

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., Kimura K., Ito K. and Hirabayashi M. *Effect of nuclear stages during in vitro maturation on the survival of bovine oocytes following vitrification*. Theriogenology, 1997; 47: 345;

Hochi, S., Kimura, K., and Hanada, A. *Effect of linoleic acid–albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae*. Theriogenology, 1999; 52: 497-504;

Hochi S., Kato M., Ito K., Hirabayashi M., Ueda M., and Sekimoto A.  
*Nuclear transfer in cattle: effect of linoleic acid-albumin on freezing sensitivity of enucleated oocytes.* J. Vet. Med. Sci., 2000; 62: 1111-1113;

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;

Honaramooz A., A. Snedaker, M. Boiani, H. Scholer, I. Dobrinski, S. Schlatt, *Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice,* Nature, 2002; 15: 778-781;

Horvath G., and Seidel G. E., Jr *Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin.* Theriogenology, 2006; 66: 1026-1033;

Hou Y., Dai Y., Zhu S., Zhu H., Wu T., Gong G., Wang H., Wang L., and Liu Y. *Bovine oocytes vitrified by the open pulled straw method and used for somatic cell cloning supported development to term.* Theriogenology, 2005; 64: 1381-1391;

Hurtt AE., Landim-Alvarenga F., Seidel GE. Jr and Squires EL. *Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws.* Theriogenology, 2000; 54: 119-128;

Hyttel P., Vajta G., and Callesen H. *Vitrification of bovine oocytes with open pulled straw method: ultrastructural consequences.* Mol. Reprod. Dev., 2000; 56: 80-88;

Ikeda S, Ichihara-Tanaka K, Azuma T, Muramatsu T, Yamada M.. *Effects of midkine during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence.* Biol Reprod, 2000; 63: 1067–1074;

Im K., Kang JK., Kim HS. *Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before*

*insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. Theriogenology, 1997; 47: 881-891;*

Imoedemhe D.G., Sique A.B. *Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propanediol. J. Assist Reprod Genet, 1992; 9: 323-327;*

Inoue S. *Cell division and the mitotic spindle. J Cell Biol, 1981; 91: 131-147;*

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 ; 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. , 2005a 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., 2005b; 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;

Jewgenow K, Penfold LM, Meyer HI-I, Wildt DE. *Viability of small preantral ovarian follicles from cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation*. J Reprod Fertil, 1998; 112: 39-47;

Jezeq D., W. Schulze, S. Kalanj-Bognar, Z. Vukelic, V. Milavec-Puretic, I. Krhen, *Effects of various cryopreservation media and freezing-thawing on the morphology of rat testicular biopsies*, Andrologia, 2001; 33: 368-378;

Johnson LA., Weitze KF., Fiser P. and Maxwell WM. *Storage of boar semen*. Anim. Reprod. Sci., 2000; 62: 143-172;

Johnson M.H., Pickering SJ. *The effect of dimethylsulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte*. Development, 1987; 100: 313-324;

Jones A., Van Blemkom J., Davis P., and Toledo A. A. *Cryopreservation of metaphase II human oocytes affects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence*. Hum. Reprod., 2004; 19: 1861-1866;

Karlsson J.O., M. Toner. *Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues*. Biomaterials, 1996; 17: 243-256;

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,

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;

Kelly J, Kleemann D, Kuwayama M, Walker S. *Effect of cysteinamine on survival of bovine and ovine oocytes vitrified using the minimum*

*volume cooling (MVC) Cryotop method.* Reprod Fertil Dev, 2006; 18: 158

Kikuchi K., Naito K., Noguchi J., Kaneko H., and Tojo H. *Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine oocytes matured in vitro.* Cloning Stem Cells, 2002; 4: 211-222;

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

Kola I., Kirby C., Shaw J., Davey A., and Trounson A. *Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses.* Teratology, 1988; 38: 467-474;

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;

Kopeika J., Zhang T., Rawson D. M., and Elgar G. *Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebrafish (Danio rerio) blastomeres cells.* Mutat. Res., 2005; 570: 49-61;

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;

Kumamoto K., Haifeng, W. Yamashiro, H. and Terada, T. *Easy and rapid method for the determination of gene expression in cumulus cells incubated for oocyte maturation.* Reprod. Biol. Endocrinol., 2005; 3: 59;

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

Kuwayama M and 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*, 2005a; 11(3): 300-308;

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

Lai P. H., Meng Q., Sielaff T. D., and Hu W. S. *Hypothermic maintenance of hepatocyte spheroids*. *Cell Transplant.*, 2005; 14: 375-389;

Landa V. and Tepla O. *Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops*. *Folia Biol. (Praha)*, 1990; 36: 153-160;

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

Lane M., Bavister BD., Lyons EA. and Forest KT. *Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos*. *Nat. Biotechnol.*, 1999b; 17: 1234-1236;

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;

Le Gal F. and Massip A. *Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment and vitrification procedure*. Cryobiology, 1999; 38: 290-300

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

Leboeuf B., Restall B. and Salamon S. *Production and storage of goat semen for artificial insemination*. Anim. Reprod. Sci., 2000; 62: 113-141.

Ledda S., Leoni G., Bogliolo L., and Naitana S. *Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking*. Theriogenology, 2001; 55: 1359-1371;

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;

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;

- Leoni G. G., Bebbere D., Succu S., Berlinguer F., Mossa F., Galioto M., Bogliolo L., Ledda, S., and Naitana S. *Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes.* Mol. Reprod. Dev., in press; 2006;
- Li G. P., Bunch T. D., White K. L., Rickords L., and Session B. R. *Denuding and centrifugation of maturing bovine oocytes alters oocyte spindle integrity and viability of cytoplasm to support parthenogenetic and nuclear transfer embryo development.* Mol. Reprod. Dev., 2006; 73: 446-451.
- 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;
- Li X., Su L., Li Y., Ji W. and Dinnyés A. *Vitrification of Yunnan Yellow Cattle oocytes: work in progress.* Theriogenology, 2002; 58: 1253-1260;

- Lim JM., Fukui Y. and Ono H. *Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization*. Theriogenology, 1992; 37: 351-361
- 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;
- Liu R. H., Sun Q. Y., Li Y. H., Jiao L. H., and Wang W. H. *Effects of cooling on meiotic spindle structure and chromosome alignment within in vitro matured porcine oocytes*. Mol. Reprod. Dev., 2003; 65: 212-218;
- 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;

Lu KH., Gordon I., Gallagher M. and Mc Govern H. *Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro.* Vet. Rec., 1987; 121: 259-260;

Luciano AM, Modina S, Gandolfi F, Lauria A, Armstrong DT. *Effect of cell-to-cell contact on in vitro deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor.* Biol Reprod, 2000; 63: 1580-1585;

Luciano AM., Lodde V., Beretta MS., Colleoni S., Lauria A. and Modina S. *Developmental capability of denuded bovine oocyte in a Co-Culture System with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate and glutathione.* Mol Reprod Develop, 2005; 71: 389-397;

Luvoni G. C., Pellizzari P., and Batocchio M. *Effects of slow and ultrarapid freezing on morphology and resumption of meiosis in immature cat oocytes.* J. Reprod. Fertil. Suppl., 1997; 51: 93-98;

Magistrini M. and Szollosi D. *Effects of cold and of isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes.*

Eur. J. Cell Biol., 1980; 22: 699-707;

Mandelbaum J. *Cryopreservation of oocytes and embryos.* Curr Opin

Obstet Gynecol, 1991; 3(5): 662-667;

Martinez AG. and Matkovic M. *Cryopreservation of ovine embryos: slow*

*freezing and vitrification.* Theriogenology, 1998; 49: 1039-1049;

Martino A., Songsasen N. and Leibo SP. *Development into blastocysts of*

*bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling.* Biol. Reprod.,

1996; 54: 1059-1069;

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;

Maxwell WMC. and Watson PF. *Recent progress in the preservation of ram semen*. Anim. Reprod. Sci., 1996; 42: 55-65;

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;

Men H., Monson R. L., Parrish J. J., and Rutledge J. J. *Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation*. Mol. Reprod. Dev., 2003; 64: 245-250;

Meng,Q. *Hypothermic preservation of hepatocytes*. Biotechnol. Prog., 2003; 19,: 1118-1127;

Messinger S.M. and Albertini D.F. *Centrosome and microtubule dynamics during meiotic progression in the mouse oocyte*. J Cell Sci, 1991; 100: 289-98;

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

Miyake T, Kasai M, Zhu SF, Sakurai T, Machida T. *Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method*. Theriogenology, 1993; 40: 121-134;

Miyamoto H. and Ishibashi T. *Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol*. J. Reprod. Fertil., 1977; 50: 373-375;

Modina S., Beretta M., Lodde V., Lauria A., and Luciano A. M. *Cytoplasmic changes and developmental competence of bovine oocytes cryopreserved without cumulus cells*. Eur. J. Histochem., 2004; 48: 337-346;

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;

Muenthaisong S., Laowtammathron C., Ketudat-Cairns M., Parnpai R., and Hochi S. *Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei*. Theriogenology, 2007; 67: 893–900;

Nagashima H., Kashiwazaki, N., Ashman R. J., Grupen C. G., Seamark R. F., and Nottle M. B. *Removal of cytoplasmic lipid enhances the*

*tolerance of porcine embryos to chilling.* Biol. Reprod., 1994; 51: 618–622;

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;

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;

Nandi S, Chauhan MS, Palta P. *Influence 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;
- Neglia G, Gasparrini 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, Gasparrini 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, 2003a; 59(5-6): 1123-30;
- Neglia G., Gasparrini B., Di Palo R., De Rosa C., Zicarelli L. and Campanile G. *Comparizon of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows.* Theriogenology, 2003 b; 60: 125-133;
- Newton H., Pegg, D. E. Barrass, R., and Gosden R. G. *Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl*

*sulphoxide of human matured oocytes*. J. Reprod. Fertil., 1999; 117: 27-33;

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;

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;

O’Neil L, Paynter SJ, Fuller BJ. *Vitrification of mature mouse oocytes, improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution*. Cryobiology, 1997; 34: 295–301.

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;

- Ogura A., J. Matsuda, T. Asano, O. Suzuki, R. Yanagimachi. *Mouse oocytes injected with cryopreserved round spermatids can develop into normal offspring*. J. Assist. Reprod. Genet., 1996; 13: 431-434;
- 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;
- Oktay K., H. Newton, J. Mullan, R.G. Gosden, *Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone*, Hum. Reprod., 1998; 13: 1133-1138;
- 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;
- Otoi T., Tachikawa S., Kondo S. and Suzuki T. *Developmental capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation in vitro and of frozen-thawed bovine embryos derived from frozen mature oocytes*. Theriogenology, 1992; 38: 711-719;

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

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;

Park M. S., Chung H. M., Cha K. Y., Hwang W. S., Lee E. S., and Lim J. M. *Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using taxol, a cytoskeleton stabilizer*. Fertil. Steril. ,2001; 75: 1177-1184;

Parkes AS. *Survival time of ovarian bomografts in two strains of rats*. J Endocrinol, 1956; 13: 201-210;

Parks JE. and Ruffing NA. *Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes*. Theriogenology, 1992; 37: 59-73;

Parks JE. *Hypothermia and mammalian gametes*. Karow AM, Critser JK (eds.), *Reproductive Tissue Banking*. San Diego: Academic Press, 1997; 229-261;

Parrott, *The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue*, *J. Reprod. Fertil.*, 1960; 1: 230–241;

Paynter S., A. Cooper, N. Thomas, B. Fuller, *Cryopreservation of multicellular embryos and reproductive tissues*, in: A.M. Karow, J.K. Critser (Eds.), *Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles*, Academic Press, New York, NY, 1997; 359–397;

Paynter S.J., J.J. McGrath, B.J. Fuller, R.W. Shaw. *A method for differentiating nonunique estimates of membrane transport properties: mature mouse oocytes exposed to glycerol*. *Cryobiology*, 1999; 39: 205-214;

Paynter S. J. *A rational approach to oocyte cryopreservation*. *Reprod. Biomed. Online*, 2005; 10: 578-586;

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

Phillips PH. and Lardy HA. *A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen*. J. Dairy Sci., 1940; 23: 399-404.

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;

Pickering SJ., Braude PR., Johnson MH., Cant A., Currie J. *Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocytes*. Fertil Steril, 1990; 54: 102-108;

Picton H.M., S.S. Kim, R.G. Gosden, *Cryopreservation of gonadal tissue and cells*, Br. Med. Bull., 2000; 56: 603-615;

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

Polge C. and Rowson LEA. *Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C*. Nature, 1952; 169: 626;

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 P.A.,Ankersmit,A. E. L. McGovan, L.T., andTervit H. R. *Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture post-thaw survival*. Theriogenology, 1998; 50: 495-506;

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°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;

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;

Rayos AA, Takashi Y, Hishinuma M. and Kanagawa H. *Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose*. J Reprod. Fertil., 1994; 100: 123-129;

Res U., P. Res, D. Kastelic, M. Stanovnik, A. Kmetec, A. Merlo. *Birth after treatment of a male with seminoma and azoospermia with cryopreserved-thawed testicular tissue*. Hum. Reprod., 2000; 15: 861-864;

Rho G. J., Kim S., Yoo J. G., Balasubranian S., Lee H. J., and Choe S. Y. *Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-*

*rapid cooling of bovine oocytes.* Mol. Reprod. Dev., 2002; 63: 464-470;

Richardson RR., Parks JE. Effects of chilling on the meiotic spindle and chromosomes of bovine ova. Theriogenology, 1992; 37: 284;

Rienzi L., Ubaldi, L., Iocobelli M., Minasi M. G., Romano S., and Greco E. *Meiotic spindle visualization in living human oocytes.* Reprod. Biomed. Online, 2005; 10: 192-198;

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;

Rottem S, Cirillo VP, de Kruffy 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;

Ruffing NA, Steponkus PL, Pitt RE, Parks JE. *Osmometric behaviour, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages*. *Cryobiology*, 1993; 30: 562-580;

Ruppert-Lingham CJ., Paynter SJ., Godfrey J., Fuller BJ. and Shaw RW. *Developmental potential of murine germinal vesicle stage cumulus-oocyte complexes following exposure to dimethylsulphoxide or cryopreservation: loss of membrane integrity of cumulus cells after thawing*. *Hum. Reprod.*, 2003; 18: 392-398;

Ruppert-Lingham C. J., Paynter S. J., Godfrey J., Fuller B. J., and Shaw R.W. *Membrane integrity and development of immature murine cumulus-oocyte complexes following slow cooling to -60°C: the effect of immediate re-warming, plunging into LN2 and two-controlled-rate-stage cooling*. *Cryobiology*, 2006; 52: 219-227;

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;

Salamon S. and Maxwell WM. *Storage of ram semen*. Anim. Reprod. Sci., 2000; 62: 77-111;

Salle B, Lomage J, Frank M, Isorad L, Rudigoz RC, Guerin JF. *Freezing thawing and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histological assessment*. Fertil Steril, 1998; 70: 124-128;

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

Sathananthan A. H., Trounson A., and Freeman L. *Morphology and fertilizability of frozen human oocytes*. Gamete Res., 1987; 16: 343-354;

Sathananthan AH., Ng SC., Trounson AO., Bongso A., Ratnam SS., Ho J., Mok H. and Lee MN. *The effects of ultrarapid freezing on meiotic*

*and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos.* Gamete Res., 1988; 21: 385-401;

Saunders K. and Parks J.E. *Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro matured bovine oocytes.* Biol Reprod, 1999; 61: 178-187

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

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;

Schlatt S., A. Honaramooz, M. Boiani, H.R. Scholer, I. Dobrinski, *Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes,* Biol. Reprod., 2003; 68: 2331-2335;

Schroeder AC, Champlin AK, Mobraatin LE, Eppig JJ. *Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro.* J Reprod Fertil, 1990; 89: 43-50;

Seidel G., Jr *Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation*. Theriogenology, 2006; 65: 228–235;

Semple E., Weissman A, Gottleib L, Casper RF, Leibo SP. *Transplantation of fresh or cryopreserved bovine ovarian cortex to NON SCID mice*. Theriogenology, 2000; 53: 264;

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;

Shaw J. M., Oranratnachai A., and Trunson A. O. *Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue*. Theriogenology, 2000; 53: 59-72;

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;

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

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

Somfai T., Dinnyés A., Sage D., Marosán M., Carnwath J.W., Ozawa M., Kikuchi K., and Niemann H. *Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated in vitro matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV)*. Theriogenology, 2006; 66: 415-422;

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

Sommerfield 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;

SPSS 12.0. *User's Guide*, SPSS Inc., Chicago, IL 60606-6307, 2005;

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

Stachecki JJ, Cohen J, Willadsen SM. *Cryopreservation of unfertilised mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium*. *Cryobiology*, 1998; 37: 346-354;

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;

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

Succu S., Leoni, G. Berlinguer, F. Mossa, F. Galioto, M. and Naitana S. *Vitrification devices affect developmental competence and biochemical properties of IVM ovine oocytes*. Reprod. Fertil. Dev., 2006; 18: 163;

Succu S, Leoni G, Bebbere D., Berlinguer F, Mossa F, Bogliolo L, Madeddu M., Ledda S. and Naitana S. *Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes*. Mol Repr Dev, 2007a; in press;

Succu S., Leoni G.G., Berlinguer F., Madeddu M., Bebbere D., Mossa F., Bugliolo L., Ledda S., Naitana S. *Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes*. Theriogenology, 2007b; 68: 107-114;

Suzuki T., Boediono A., Takagi M., Saha S. and Sumantri C. *Fertilization and development of frozen–thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method in vitro*. *Cryobiology*, 1996; 33: 515–524;

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

Tanghe S, Van Soom A, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L, de Kruif A. *Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro*. *Theriogenology*, 2003; 60: 135–149.

Taru Sharma G. and K. Loganathasamy K. *Effect of meiotic stages during in vitro maturation on the survival of vitrified-warmed buffalo oocytes*. *Veterinary Research Communications*, 2007;

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;
- Tharasanit T., Yamaji, Y. Kleinhans, F. W. Magosaburo, K. Colenbrander, B. and Stout, T. A. E. *Effect of maturation stage at cryopreservation on post-thaw cytoskeleton quality and fertilizability of equine oocytes*. Mol. Reprod. Dev., 2006; 73: 627-637;
- Thibier M. *The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives*. Reprod. Nutr. Dev., 2003; 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;
- Tian SJ., Yan CL., Yang HX., Zhou GB., Yang ZQ., Zhu SE. *Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of in vitro matured ovine oocytes and decrease sperm penetration*. Animal Reprod Sc, 2007; in press;

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;

Vajta G., and Kuwayama M. *Improving cryopreservation systems*. Theriogenology, 2006; 65: 236-244;

- Valojerdi M. R., and Salehnia M. *Developmental potential and ultrastructural injuries of metaphase II (M II) oocytes after slow freezing or vitrification*. J. Assist. Reprod. Genet., 2005; 22: 119-127;
- Van Blerkom J. *Cryopreservation of the mammalian oocyte*. *Animal Applications of Research in Mammalian Development*. Cold Spring harbor laboratory Press, 1991; 9: 83-119;
- 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;
- 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;
- Vanderhyden BC., McLaughlin KJ., Rutledge JM. and Armstrong DT. *Zona drilling increases the penetrability of rat oocytes matured in vitro*. Biol. Reprod., 1989; 40: 953-960;

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;

Vieira A. D., Mezzalira A., Barbieri D. P., Lehmkuhl R. C., Rubin M. I., and Vajta G. *Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes.* Cryobiology, 2002; 45: 91-94;

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;

Vincent C. and Johnson MH. *Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte.* Oxf Rev Reprod Biol, 1992; 14: 73-100) ;

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;

Vishwanath R. and Shannon P. *Storage of bovine semen in liquid and frozen state.* Anim. Reprod. Sci., 2000; 62: 23-52;

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;

Wani NA., Maurya SN., Misra AK., Saxena VB. and Lakhchaura BD.

*Effect of cryoprotectants and their concentration on in vitro*

*developmant of vitrified-warmed immature oocytes in buffalo*

*(Bubalus bubalis).* *Theriogenology*, 2004; 61: 831-842;

Warfield SJ, Seidel GE. Jr and Elsden RP. *Transfer of bovine demi-*

*embryos with and without the zona pellucida.* *J. Anim. Sci.*, 1987; 65:

756-761;

Wassarman PM, Albertini DF. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The*

*physiology of reproduction.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1994;

79–122;

Webb M., Howlet S., Maro B. *Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs*. J Embryol Exp Morphol, 1986; 95: 131-145;

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

Whittingham DG., Leibo SP. and Mazur P. *Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-269^{\circ}\text{C}$* . Science 1972; 178: 411-414.

Whittingham DG. *Fertilization in vitro and development to term of unfertilised mouse oocytes previously stored at  $-196^{\circ}\text{C}$* . 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;

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

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

Wiston RML, McClure Browne JC. *Pregnancy following autograft trasplantation of fallopian tube and ovary in the rabbit*. Lancet, 1974; 494-495;

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;

Wood MJ., Barros C., Candy CJ., Carroll J., Melendez J. and Whittingham DG. *High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethylsulfoxide*. Biol. Reprod., 1993; 49: 489-493;

Wood MJ., Whittingham DG. and Lee Sang HO. *Fertilization failure of frozen mouse oocytes is not due to premature cortical granule release*. Biol. Reprod., 1992; 46: 1187-1195;

Woods E. J., Benson J. D., Agca Y., and Critser J. K. *Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues*. Cryobiology, 2004; 48: 146-156;

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

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;

Yang BS. and Leibo SP. *Viability of in vitro-derived bovine zygotes cryopreserved in microdrops*. Theriogenology, 1999; 51: 178;

Yin H., X. Wang, S.S. Kim, H. Chen, S.L. Tan, R.G. Gosden.  
*Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype*. Hum. Reprod., 2003; 18: 1165-1172;

Younis A. I., Toner M., Albertini D. F., and Bigger J. D. *Cryobiology of non-human oocytes*. Hum. Reprod., 1996; 11: 156-165;

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

Zeron Y, Pearl M, Borochof 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, Borochof 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;

Zeron Y., Pearl, M. Borochof, A. and Arav, A. *Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and matured bovine oocyte*. Cryobiology, 1999; 38: 35-42;

Zeron Y., Tomczak M., Crowe J., and Arav A. *Effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity*. Cryobiology, 2002a; 45: 143-152;

Zeron Y., Sklan D., and Arav A. *Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes.* Mol. Reprod. Dev., 2002b; 61: 271-278;

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

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

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