

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

*SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE VETERINARIE*

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXVII CICLO)

Coordinatore: Prof. Vincenzo Carcangiu

Vitrificazione dell'ovocita ovino: analisi delle modificazioni strutturali e molecolari

Docente Guida

Dott.ssa Luisa Bogliolo

Direttore

Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato della

Dott.ssa Ombretta Murrone

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

INDICE

1 - INTRODUZIONE	3
1.1 Criobiologia.....	6
1.1.1 <i>Aspetti generali</i>	6
1.1.2 <i>I crioprotettori</i>	8
1.1.3 <i>Tecniche di crioconservazione</i>	10
1.1.4 <i>La crioconservazione dell'ovocita</i>	11
1.1.5 <i>La vitrificazione dell'ovocita</i>	13
1.2 Problematiche della crioconservazione dell'ovocita.....	16
1.2.1 <i>Alterazioni delle componenti citoscheletriche</i>	18
• <i>Microtubuli</i>	
• <i>Microfilamenti</i>	
1.2.2 <i>Modificazioni dello stato ossido-riduttivo intracellulare</i>	23
1.2.3 <i>Alterazioni molecolari</i>	25
1.2.4 <i>Effetti sull'omeostasi del calcio</i>	26
1.3 Strategie di miglioramento.....	28
1.3.1 <i>Stadio meiotico</i>	28
1.3.2 <i>Esposizione ai CPA e composizione dei medium</i>	31
1.3.3 <i>Stabilizzatori del citoscheletro</i>	33
1.3.4 <i>Antiossidanti</i>	34
1.3.5 <i>Sviluppo di tecniche di analisi non invasive</i>	35
• <i>Microspettroscopia Raman</i>	
1.4 Vitrificazione dell'ovocita ovino.....	37
1.4.1 <i>Vitrificazione dell'ovocita maturo</i>	37
1.4.2 <i>Vitrificazione dell'ovocita immaturo</i>	41
1.4.3 <i>Vitrificazione dell'ovocita di prepubere</i>	44
2 - OBIETTIVO DELLA SPERIMENTAZIONE	47
• <i>Disegno Sperimentale</i>	49
3 - MATERIALI E METODI	50
3.1 <i>Collezione degli ovociti</i>	50
3.2 <i>Maturazione in vitro</i>	51
3.3 <i>Vitrificazione e ripristino della temperatura</i>	52
3.4 <i>Valutazione della configurazione della cromatina e</i> <i>analisi delle componenti citoscheletriche</i>	57
3.5 <i>Analisi dell'espressione genica</i>	60
3.6 <i>Analisi dei livelli di ROS e attività mitocondriale</i>	64
3.7 <i>Analisi statistica</i>	65

4 - ESPERIMENTO 1	66
4.1 Obiettivo.....	66
4.2 Definizione dei gruppi sperimentali.....	66
• <i>Disegno sperimentale</i>	67
4.3 Risultati.....	68
1) <i>Valutazione della sopravvivenza</i>	68
2) <i>Valutazione della competenza meiotica</i>	70
3) <i>Valutazione della configurazione della cromatina e delle componenti citoscheletriche</i>	72
4) <i>Analisi dell'espressione genica</i>	75
5 - ESPERIMENTO 2	77
5.1 Obiettivo.....	77
5.2 Definizione dei gruppi sperimentali.....	77
• <i>Disegno sperimentale</i>	78
5.3 Risultati.....	79
1) <i>Valutazione della sopravvivenza</i>	79
2) <i>Valutazione della cromatina e delle componenti citoscheletriche</i>	80
3) <i>Analisi dell'espressione genica</i>	84
4) <i>Analisi delle modificazioni dello stato ossido-riduttivo</i>	86
6 - ESPERIMENTO 3	90
6.1 Obiettivo.....	90
6.2 Metodologia.....	90
6.2.1 <i>Trattamento con Latrunculina A (LATA)</i>	91
6.2.2 <i>Preparazione degli ovociti per l'analisi RMS</i>	91
6.2.3 <i>Misurazioni RMS</i>	91
1) <i>Scansioni puntiformi</i>	
2) <i>Imaging di singoli ovociti</i>	
6.2.4 <i>Analisi dei dati</i>	93
6.3 Risultati.....	94
1) <i>Trattamento con LATA</i>	94
2) <i>Esposizione ai crioprotettori e vitrificazione</i>	95
3) <i>RMS Imaging e immunofluorescenza dell'actina</i>	97
7 - DISCUSSIONE	99
8 - CONCLUSIONI	113
9 - BIBLIOGRAFIA	116

1 - INTRODUZIONE

Lo sviluppo delle biotecnologie riproduttive negli ultimi decenni ha contribuito in maniera rilevante all'introduzione di tecniche che trovano impiego sia in campo veterinario che in campo umano. Le potenzialità applicative delle biotecnologie riproduttive in campo veterinario sono molteplici. In primo luogo le tecniche di riproduzione assistita rappresentano uno strumento di fondamentale importanza dal punto di vista zootecnico per il miglioramento dell'efficienza riproduttiva degli animali e l'accelerazione della selezione genetica. Le biotecnologie riproduttive costituiscono, altresì, un valido ausilio per la cura di forme di ipofertilità e per permettere la continuità riproduttiva in animali affetti da turbe riproduttive o anziani. Inoltre, nell'ambito di un generale interesse per conservazione della biodiversità animale tali biotecnologie possono trovare applicazione per il recupero e la salvaguardia di specie selvatiche in via di estinzione o a ridotta consistenza numerica. Normalmente, infatti, le specie selvatiche mostrano scarse performances riproduttive sia in cattività che in normali condizioni probabilmente a causa di una diminuita diversità genetica scaturita dall'imbreding dovuto all'isolamento geografico (Roldan et al., 2006). In campo umano, le biotecnologie riproduttive hanno fornito un enorme strumento per la gestione di problematiche legate all'infertilità maschile e femminile e la nascita di Luise Brown avvenuta nel 1978 (Stephoe et al., 1978) è considerata una delle pietre miliari della storia della Procreazione Medicalmente Assistita.

La crioconservazione del germoplasma riveste un ruolo cruciale nell'ambito delle biotecnologie riproduttive, poiché la possibilità di poter conservare per periodi illimitati embrioni, spermatozoi ed ovociti amplia enormemente il campo di applicazione delle tecniche di riproduzione assistita. In ambito zootecnico, la disponibilità di banche di gameti ed embrioni ha facilitato l'utilizzo di tecniche quali l'inseminazione artificiale con seme

congelato ed embryo transfer, semplificando l'organizzazione e l'attuazione di programmi di miglioramento genetico, evitando lo spostamento degli animali e migliorando le condizioni di benessere animale, prevenendo, al contempo, la propagazione delle malattie infettive ed infestive. Il congelamento del materiale seminale è una tecnica che ormai perfezionata e sviluppata da tempo e il seme congelato viene utilizzato routinariamente nella pratica della inseminazione artificiale in numerose specie zootecniche, permettendo di allargare enormemente la distribuzione di determinate razze e di apportare un notevole contributo al miglioramento genetico degli animali (Curry, 2007). Tuttavia nonostante la bontà di tali risultati ancor oggi si lavora con grande entusiasmo su tale tecnologia al fine di migliorarne l'efficienza. Al contrario, la crioconservazione degli embrioni resta al momento una tecnica ancora poco standardizzata, applicata solo in zone ad alta vocazione zootecnica ed in tutti i casi eseguita solo nella specie bovina.

Per quanto riguarda il germoplasma femminile (tessuto ovarico/ovocita), sono molte ancora le problematiche legate alla sua crioconservazione, soprattutto nel settore animale. In ambito umano, la crioconservazione del tessuto ovarico riveste particolare interesse nel preservare la fertilità delle pazienti oncologiche, in alternativa alla crioconservazione degli ovociti e applicata nei casi in cui non è possibile l'utilizzo di trattamenti ormonali, o nelle pazienti oncologiche in età pediatrica (Donnez et al., 2011). In ambito veterinario, la crioconservazione del tessuto ovarico trova applicazione nella conservazione di animali in via di estinzione e ad alto valore genetico (Santos et al., 2010).

Nell'ambito della crioconservazione del germoplasma femminile, la crioconservazione dell'ovocita mostra notevoli vantaggi da un punto di vista applicativo. Essa rappresenta una valida strategia per la tutela della fertilità nelle donne sottoposte a terapie antitumorali (Trudgen et al., 2014). E' ben noto, infatti, che radioterapia e chemioterapia possono abbattere le riserve follicolari ovariche, determinando l'insorgenza della sindrome del fallimento

ovarico prematuro e della menopausa precoce (Dursun et al., 2014). Questa tecnica fornisce un'opzione per la tutela della fertilità nelle donne con storia familiare di menopausa precoce o per quelle donne che, per questioni personali e lavorative, decidono di posticipare la maternità. La crioconservazione dell'ovocita fornisce un'alternativa al congelamento dell'embrione, permettendo il superamento di problematiche etiche e legali collegate con questa pratica. Inoltre, il suo utilizzo si rende necessario per l'allestimento di banche dei programmi di ovodonazione delle unità di PMA. In ambito veterinario, l'utilizzo della crioconservazione dell'ovocita trova applicazione nella tutela della biodiversità delle specie di interesse zootecnico (Mara et al., 2013) e per la conservazione di risorse genetiche di animali in pericolo di estinzione o di alto valore genetico (Comizzoli et al., 2014).

Nonostante siano stati effettuati numerosi progressi, la crioconservazione del gamete femminile rimane ancora una tecnica sperimentale soprattutto in campo animale. Infatti, le attuali evidenze indicano come la crioconservazione dell'ovocita umano sia ormai standardizzata e applicata con successo (Cobo et al., 2011), mentre nell'animale l'efficienza non ha ancora raggiunto livelli soddisfacenti.

1.1 CRIOBIOLOGIA

1.1.1 Aspetti generali

La sfida principale della criobiologia è conservare le cellule in uno stato di animazione sospesa per lunghi periodi di tempo, preservando al contempo la loro capacità di riprendere vita al momento del ripristino della temperatura e di svolgere tutte le normali funzioni biologiche. I punti maggiormente critici della crioconservazione sono le fasi di transizione che avvengono durante l'iniziale fase di raffreddamento e durante il ripristino della temperatura. I principali obiettivi di un processo di crioconservazione sono rivolti alla riduzione dei seguenti fenomeni fisici:

- Formazione dei cristalli di ghiaccio

La nucleazione del ghiaccio, in seguito alla discesa termica al di sotto di 0°C, inizia con la casuale aggregazione delle molecole di acqua che formano nuclei microscopici. La presenza di nuclei di ghiaccio nel compartimento cellulare non comporta, di per sé, il danneggiamento delle strutture cellulari, ma la progressiva aggregazione delle molecole di acqua circostanti determina il rapido accrescimento del nucleo, fino alla formazione di macroscopici cristalli con esiti potenzialmente letali (Miller e Mazur, 1976). La fase maggiormente critica in cui avviene la formazione dei cristalli è l'iniziale fase di raffreddamento. Tuttavia, se il ripristino della temperatura non avviene con sufficiente rapidità, l'acqua libera rilasciata ha alte probabilità di tornare nuovamente nella forma cristallina, danneggiando le strutture circostanti.

- Effetto della soluzione

Durante il processo di raffreddamento, l'acqua libera diminuisce progressivamente, in quanto sequestrata all'interno della struttura cristallina. Ciò comporta che i soluti presenti nella

soluzione non ancora congelata raggiungano elevate concentrazioni, tossiche per le cellule (Lovelock, 1954).

- Shock osmotico

Durante il ripristino della temperatura, l'improvviso rilascio di acqua libera nello spazio extracellulare induce un'improvvisa caduta della pressione osmotica nello spazio extracellulare. Per fenomeni osmotici si ha un netto movimento di acqua dal compartimento extracellulare verso il citosol, che determina il rigonfiamento e lisi cellulari (Mazur, 1980).

L'impiego di sostanze chimiche, indicate con il termine generale di crioprotettori (CPA), permette di limitare il danneggiamento cellulare indotto dai fenomeni fisici collegati con la transizione di stato dell'acqua.

1.1.2 I crioprotettori

I comuni crioprotettori impiegati durante le procedure di crioconservazione si dividono in due categorie principali: penetranti e non penetranti.

I crioprotettori penetranti sono una famiglia di piccole molecole con $PM < 400$ in grado di oltrepassare la membrana cellulare. Essi fluiscono nel compartimento intracellulare, sostituendo la maggior parte delle molecole di acqua e formano legami ad idrogeno con le molecole acquose residue. Per le proprietà colligative delle soluzioni, si ottiene l'abbassamento del punto di congelamento e riduzione della probabilità di formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare. Durante il congelamento lento, la presenza di crioprotettori penetranti, combinata con una lenta e graduale discesa termica, favorisce l'inizio della nucleazione del ghiaccio preferenzialmente nel compartimento extracellulare. La presenza di nuclei cristallini extracellulari richiama l'acqua libera dal citoplasma, inducendo una graduale disidratazione. In tal modo, il modesto quantitativo residuo di acqua libera intracellulare può formare solo piccoli cristalli non letali. Se la concentrazione dei crioprotettori è molto elevata e combinata con un raffreddamento estremamente rapido, si verifica la totale inibizione della cristallizzazione, favorendo il verificarsi del processo di "vitrificazione" (Saragusty et al., 2011). L'aggiunta di crioprotettori penetranti prima del congelamento consente la riduzione degli effetti di soluzione. Infatti, essi, restando in soluzione, diluiscono gli elettroliti che sono esclusi dall'acqua durante le fasi di solidificazione. Esiste un gran numero di molecole idonee all'utilizzo come agenti crioprotettori, tuttavia la maggior parte di essi risultano tossici per le cellule, in particolar modo, alle alte concentrazioni richieste per la vitrificazione. I più comunemente utilizzati nella pratica comprendono molecole quali glicole propilenico (PROH), etilen glicol (EG), dimetilsolfossido (DMSO) e il glicerolo.

I crioprotettori non penetranti sono costituiti da molecole ad alto peso molecolare, solitamente $PM > 1000$, che non sono in grado di attraversare la membrana plasmatica. Di solito, si tratta

di molecole zuccherine e hanno la funzione è di richiamare acqua al di fuori della cellula, favorendone la disidratazione. Possono, inoltre, esercitare un effetto protettivo nei confronti delle membrane, interagendo e stabilizzando le teste idrofiliche dei fosfolipidi. Esempi di crioprotettori non penetranti comunemente utilizzati sono saccarosio, glucosio, fruttosio, trealosio e proteine (Barcelo-Fimbres et al., 2007). Quando sono utilizzati in combinazione con crioprotettori penetranti, essi ne facilitano l'ingresso nel compartimento intracellulare. Essi svolgono un ruolo fondamentale nel prevenire lo shock osmotico durante lo scongelamento, che può verificarsi quando il crioprotettore non abbandona la cellula abbastanza velocemente. La presenza di alte concentrazioni di crioprotettori non penetranti favorisce, per questioni osmotiche, il più rapido rilascio dei crioprotettori penetranti. Contemporaneamente, aumentando la concentrazione di soluti nel compartimento extracellulare, i crioprotettori non penetranti si oppongono al richiamo di acqua nel citosol, prevenendo la lisi cellulare (Jain et al., 2006).

1.1.3 Tecniche di crioconservazione

Attualmente, le due principali tecniche impiegate in ambito criobiologico, sono costituite dal “congelamento lento” e dalla “vitrificazione”.

La crioconservazione tramite congelamento lento prevede l’esposizione delle cellule, per diversi minuti, a ridotte concentrazioni di crioprotettori a basse temperature (-5,-7°C), seguita da una graduale discesa termica, controllata in maniera automatizzata, fino a temperature comprese tra -30 e -65°C. La discesa termica è ottenuta attraverso cooling rate compresi tra 0,3-0,5°C/min, favorendo la disidratazione cellulare e la nucleazione del ghiaccio preferenzialmente nel compartimento extracellulare, riducendo la probabilità di danneggiamenti di membrane e organuli citoplasmatici (Mazur, 1963).

A differenza del congelamento lento, la vitrificazione prevede l’esposizione della cellula a concentrazioni elevate di crioprotettori, seguita dalla diretta immersione in azoto liquido (-196°C), ottenendo tassi di raffreddamento nell’ordine di diverse decine di migliaia di gradi centigradi al minuto. Questa tecnica permette di conservare le cellule solidificandole in uno stato della materia simile al vetro, in totale assenza di cristalli di ghiaccio. La possibilità di conservare le cellule tramite questo processo fisico era già stata descritta nel 1937, da Basil Luyet.

Tuttavia, come hanno precisato Saragusty e Arav nel 2011, è riduttivo sintetizzare che l’unica differenza tra le due tecniche risieda nell’utilizzo di basse concentrazioni di crioprotettori e bassi cooling rate o nell’utilizzo di alte concentrazioni di crioprotettori combinati ad un raffreddamento estremamente veloce. Ad una definizione più completa, andrebbe aggiunto che durante il congelamento lento si induce la disidratazione cellulare per favorire la cristallizzazione del ghiaccio nell’ambiente extracellulare, mentre, nella vitrificazione, sia l’ambiente cellulare che quello extracellulare vitrificano, dopo che la cellula è stata già disidratata.

1.1.4 La crioconservazione dell'ovocita

La crioconservazione dell'ovocita riveste un ruolo strategicamente importante nell'ambito delle biotecnologie riproduttive, trovando applicazioni sia in campo animale che umano. Interessanti aspetti applicativi della crioconservazione dell'ovocita risiedono, in ambito animale, nella possibilità di creare banche finalizzate alla salvaguardia dell'integrità genetica delle popolazioni locali, alla conservazione di materiale genetico di specie in via di estinzione (Comizzoli et al., 2014), al trasporto a lunga distanza di materiali, per consentire lo svolgimento di programmi di ricerca e/o applicativi e, in generale, al sostegno della biodiversità animale (Mara et al., 2013) e, in ambito umano, nella possibilità di preservare la fertilità in donne, anche molto giovani, sottoposte a terapie oncostatiche (Trudgen et al., 2014) o con storia familiare di esaurimento ovarico precoce (Dursun et al., 2014). Inoltre, la crioconservazione dell'ovocita permette di superare problemi etici e legali della crioconservazione dell'embrione soprattutto in Italia alla luce della legge 40/2004. Nonostante siano stati riportati significativi progressi che hanno portato a nascita di prole (Dessolle et al., 2009), l'ovocita di mammifero rimane uno dei tipi cellulari più difficili da crioconservare. Le tecniche disponibili per la crioconservazione dell'ovocita risiedono nel congelamento lento e nella vitrificazione.

In campo riproduttivo, il primo successo riportato utilizzando il congelamento lento risale al 1971, anno in cui Whittingham riportò esito positivo in seguito alla crioconservazione di embrioni di topo. Nell'uomo, la prima gravidanza ottenuta da un embrione crioconservato tramite congelamento lento è stata ottenuta da Trounson e Mohr nel 1983. Tre anni dopo, nel 1986, Chen è stata registrata anche la prima gravidanza in seguito al congelamento lento dell'ovocita. Il primo successo della vitrificazione in campo riproduttivo è stato, invece, conseguito nel 1985, quando Rall e Fahy riuscirono a vitrificare degli embrioni di topo. Tuttavia, la prima nascita di un bambino da un ovocita vitrificato è stata riportata più

recentemente, nel 1999, da Kuleshova et al.

Le evidenze sperimentali indicano che la vitrificazione ha un impatto inferiore sulla fisiologia dell'ovocita rispetto al congelamento lento. In particolare, gli studi indicano che la sopravvivenza, la fertilizzazione, lo sviluppo embrionale e i tassi di impianto sono tendenzialmente migliori in seguito alla crioconservazione tramite vitrificazione (Kuleshova et al., 2002; Kuwayama et al., 2005; Borini et al., 2008; Cobo et al., 2008; Loutradi et al., 2008; Smith et al., 2010; Fasano et al., 2010; Gualtieri et al., 2011; Cobo et al., 2011; Glujovsky et al., 2014).

Anche da un punto di vista tecnico, la tecnica di vitrificazione dell'ovocita presenta notevoli vantaggi rispetto al congelamento lento. Non sono, infatti, necessarie strumentazioni sofisticate per ottenere la discesa termica controllata ed essa può essere eseguita in maniera relativamente economica e, rispetto al congelamento lento, la vitrificazione permette di ridurre i tempi in cui l'ovocita rimane in condizioni non fisiologiche.

1.1.5 La vitrificazione dell'ovocita

La vitrificazione dell'ovocita è ottenuta esponendo i gameti a soluzioni contenenti elevate concentrazioni di crioprotettori, seguita da un repentino calo della temperatura. La maggior parte delle soluzioni di utilizzate per ovociti ed embrioni è costituita da una soluzione fisiologica, alla quale sono aggiunti uno o due crioprotettori penetranti, come DMSO ed EG, combinati ad un crioprotettore non penetrante, costituito solitamente da una molecola glucidica, e una componente proteica, solitamente siero, che migliora la stabilità di membrana (Anchoroguy et al., 1987). L'utilizzo di soluzioni di vitrificazione ad alta viscosità, combinata con l'abbassamento ultrarapido della temperatura, è una condizione necessaria affinché il campione solidifichi istantaneamente in uno stato vitreo.

La probabilità di vitrificazione dipende prevalentemente da tre diversi fattori: il cooling rate, la viscosità della soluzione di vitrificazione e il volume. L'influenza di questi tre fattori può essere riassunta dalla seguente equazione (Saragusty et al., 2011):

$$\text{Probabilità di vitrificazione} = \frac{\text{Cooling rate} \times \text{viscosità}}{\text{volume}}$$

- Cooling rate

Il cooling rate influenza positivamente la probabilità di vitrificazione. Durante il processo di vitrificazione, il campione è direttamente immerso in azoto liquido, raggiungendo cooling rate di decine di migliaia di gradi centigradi al minuto. Tutti i fattori che ostacolano una discesa termica ultrarapida influenzano negativamente la riuscita della vitrificazione. Un abbondante volume della soluzione in cui l'ovocita è contenuto potrebbe, ad esempio, ostacolare lo scambio di calore tra soluzione e azoto liquido. Lo spessore del contenitore o supporto attraverso cui l'ovocita viene immerso in azoto, potrebbe, a sua volta, rallentare lo scambio termico. Per ovviare a questi problemi, i supporti che si utilizzano nella vitrificazione sono progettati per massimizzare il contatto tra azoto e campione e limitare il volume di

caricamento.

- Viscosità

La viscosità del mezzo di vitrificazione influenza positivamente la probabilità di vitrificazione. In linea teorica, maggiore è la concentrazione dei crioprotettori e maggiore sarà la viscosità del mezzo. Tuttavia, nella pratica non si può trascurare che gli stessi crioprotettori abbiano effetti tossici sulle cellule. Per raggiungere un buon compromesso tra crioprotezione e contenimento di danni, una strategia è quella di utilizzare una miscela di crioprotettori diversi, combinando crioprotettori penetranti e non penetranti. Un'altra alternativa è quella di esporre gli ovociti ai crioprotettori in più step, ovvero effettuare una prima esposizione ad soluzione di crioprotettori a concentrazione più bassa, per poi trasferirli nella soluzione di vitrificazione finale a concentrazione più alta (Vajita et al., 1998).

- Volume

Il volume della soluzione in cui è immerso l'ovocita deve essere minimo, in modo da favorire lo scambio di calore e il raggiungimento di cooling rate ultrarapidi. I supporti per la vitrificazione sono progettati in modo da consentire il caricamento del campione in volumi molto piccoli di soluzione, nell'ordine di 0,1 uL. La funzione dei supporti di vitrificazione è quella di fornire un mezzo per l'inserimento degli ovociti nell'azoto liquido e per il loro recupero per lo scongelamento. I più comunemente utilizzati sono:

- Cryotop (Kuwayama e Kato, 2000)
- Griglie da microscopia elettronica (Steponkus et al., 1990)
- Cryoloop (Lane et al., 1999)
- Hemi-straw (Vanderzwalmen et al., 2000)
- Cryoleaf (Chian et al., 2005)
- Vitrification spatula (Tsang e Chow, 2009)
- Open pulled straw (OPS) (Vajita et al., 1997)
- Superfine OPS (Isachenko et al., 2001)

La maggior parte dei supporti di vitrificazione pongono il campione a diretto contatto con l'azoto liquido. Da un lato, ciò facilita il trasferimento di calore aumentando il successo di vitrificazione, ma, dall'altro, espone in campioni al rischio di contaminazioni. Infatti, virus, batteri e funghi possono sopravvivere nell'azoto liquido e dare luogo a cross-contaminazioni tra i vari campioni presenti nel recipiente di stoccaggio (Bielanski, 2014). Per questo motivo, la ricerca è orientata alla creazione di sistemi di vitrificazione chiusi che riducano il rischio di questo fenomeno. Alcuni di questi supporti sono:

- Paillette di plastica (Rall and Fahy, 1985)
- Closed pulled straw (CPS) (Chen et al., 2001)
- Cryotip (Kuwayama et al., 2005)
- High-security vitrification device (Camus et al., 2006)
- Cryopette (Portman et al., 2010)

La messa a punto di sistemi di sterilizzazione dell'azoto, tuttavia, potrebbe contribuire sostanzialmente alla riduzione dei fenomeni di cross-contaminazioni (Parmegiani et al., 2011, 2012).

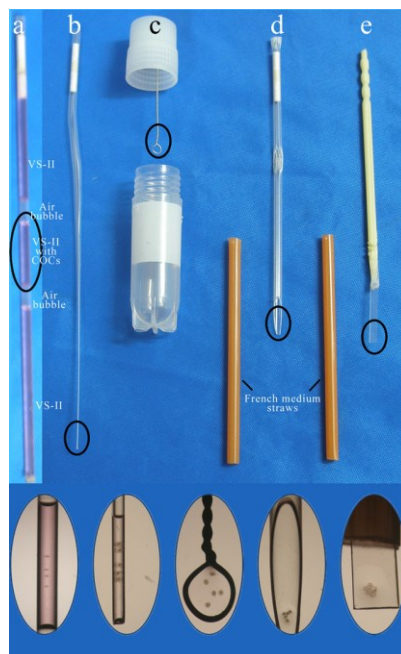


Fig 1.1: Comuni supporti di vitrificazione: A) paillette convenzionale; B) open pulled straw (OPS); C) cryoloop; Hemi-straw; D) cryotop. (Immagine da Rao et al., 2012)

1.2 PROBLEMATICHE DELLA CRIOCONSERVAZIONE DELL'OVOCITA

Rispetto alle cellule somatiche, la crioconservazione dell'ovocita è una procedura particolarmente difficoltosa. Il primo ostacolo alla crioconservazione è costituito dalle grandi dimensioni che rendono il rapporto volume/superficie sfavorevole, influenzando negativamente la disidratazione e aumentando la probabilità di formazione intracellulare di cristalli di ghiaccio (Arav et al., 1996; Zeron et al., 1999). Comparativamente alle cellule somatiche, la membrana plasmatica dell'ovocita presenta una composizione fosfolipidica differente, che lo rende poco adattabile ai comuni protocolli di crioconservazione. Studi specifici hanno rilevato che nella membrana plasmatica ovocitaria è presente un minor quantitativo di acidi grassi insaturi e le diverse proprietà chimico-fisiche dell'oolemma determinano un basso coefficiente di permeabilità, con riduzione del movimento di acqua e crioprotettori (Ruffing et al., 1993). In aggiunta, la presenza della zona pellucida, esternamente alla membrana, ostacola ulteriormente il movimento dei crioprotettori tra il compartimento intracellulare ed extracellulare.

Un successivo fattore che influenza negativamente la crioconservazione dell'ovocita è il contenuto lipidico del citoplasma. Infatti, i lipidi citoplasmatici alterano l'uniformità della crioconservazione, rendendo l'ovocita maggiormente suscettibile ai danneggiamenti da raffreddamento (Isachenko et al., 2001a; Genicot et al., 2005). Questo fenomeno è particolarmente evidente per gli ovociti di animali di interesse zootecnico e d'affezione, in cui il contenuto lipidico citoplasmatico è notevole (Ledda et al., 2000). La riuscita della crioconservazione di ovociti con un limitato contenuto lipidico, tra cui la specie umana e murina, è decisamente maggiore se comparata con quella di specie come bovino, suino, ovino, equino, cane, gatto. L'origine dell'ovocita, come collezione in vivo o produzione in vitro e fattori come specie, razza, stato fisiologico, alimentazione possono influenzare il contenuto lipidico del gamete (Abe et al., 2000; McEvoy et al., 2000; Zeron et al., 2001). Gli ovociti di

bovino, per esempio, sono meno suscettibili alla crioconservazione dell'ovocita di suino, probabilmente a causa del differente numero e forma delle gocce lipidiche, così come alla diversa composizione chimica dei lipidi (Isachenko et al., 2001°, McEvoy et al., 2000). Il contenuto lipidico può essere influenzato dalle condizioni di coltura dell'ovocita. E' stato suggerito che la presenza di siero sia responsabile dell'incremento lipidico intracellulare, causato da un eccessivo up-take di lipidi dal medium di coltura (Leroy 2005, Abe et al., 2002), che può, tuttavia, essere limitato, utilizzando un sistema di coltura privi di siero (Pereira et al., 2008). Studi sul bovino e sul suino sono stati indirizzati verso strategie per la riduzione del contenuto lipidico intracellulare. E' stata proposta la delipidazione meccanica, ottenuta attraverso la polarizzazione delle gocce lipidiche citoplasmatiche tramite centrifugazione, seguita dalla rimozione fisica dell'eccesso di lipidi (Nagashima et al., 1999; Ushijima et al., 1999). La delipidazione chimica è stata altresì testata, utilizzando agenti lipolitici in grado di stimolare la lipolisi dei tracicilgliceroli (Men et al., 2006).

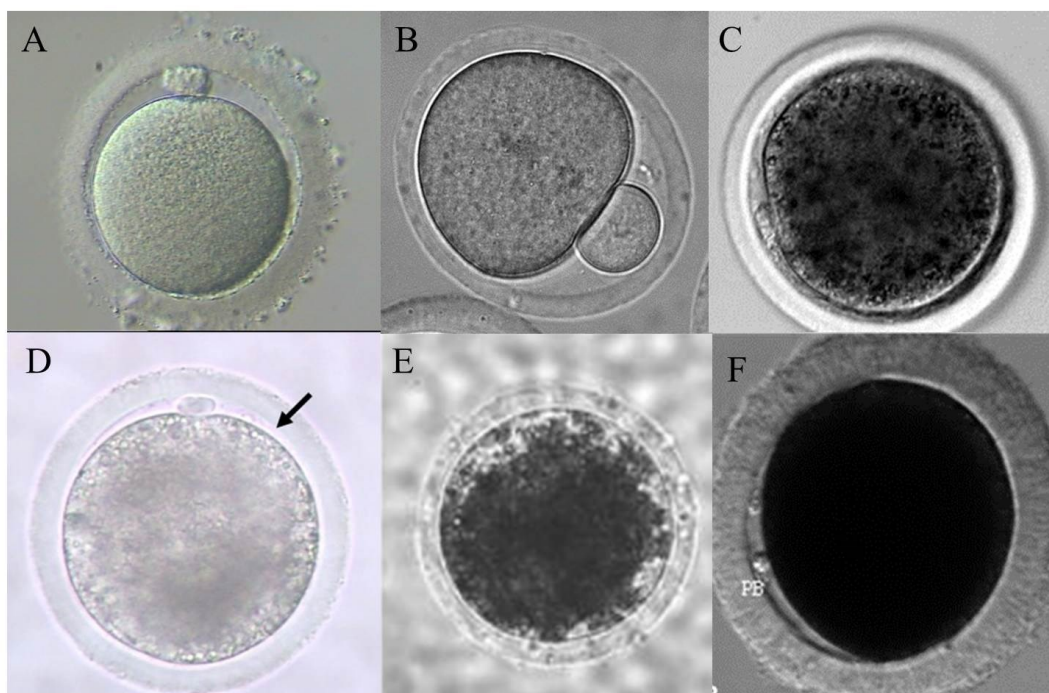


Fig 1.2: Diverso contenuto lipidico in ovociti in diverse specie: uomo (A); topo (B); pecora (C) bovino (D); bovino; maiale (E); cane (F).

1.2.1 Alterazioni delle componenti citoscheletriche

- **Microtubuli**

I microtubuli che costituiscono il fuso meiotico sono lunghe strutture proteiche cave, formate dalla polimerizzazione di dimeri di α e β tubulina (Fig. 2.3). Una peculiarità dei microtubuli è la loro struttura dinamica, determinata dall'equilibrio continuo tra polimerizzazione e depolimerizzazione dei dimeri di tubulina. Durante la meiosi, i microtubuli svolgono l'importante funzione di ancorare i cromosomi e dirigere il loro movimento durante i vari stadi della progressione meiotica. La maggior parte degli studi è focalizzata sull'utilizzo del gamete maturo come stadio meiotico d'elezione per la crioconservazione ed esso viene utilizzato di routine per la crioconservazione del germoplasma femminile, nell'ambito della PMA. La caratteristica più affascinante dell'ovocita maturo è certamente costituita dalla presenza del fuso meiotico della metafase II (MII), ma, tuttavia, esso costituisce proprio una delle componenti maggiormente alterabili durante la procedura. E' stato, infatti, più volte dimostrato che il raffreddamento e l'esposizione ai crioprotettori tende a spostare l'equilibrio dinamico dei microtubuli verso la depolimerizzazione, provocando perciò la parziale o totale distruzione del fuso meiotico durante la crioconservazione (Larman et al., 2007; Gomes et al., 2008). Le conseguenze che derivano dal disassemblamento del fuso riguardano principalmente la dispersione dei cromosomi e la comparsa di aberrazioni cromosomiche (Boiso et al., 2002; Kola et al., 1988). Tuttavia, è stato osservato che l'ovocita può essere in grado di riparare il danno, rendendo, perciò, il fenomeno parzialmente o totalmente reversibile. Infatti, coltivando in vitro l'ovocita per un periodo variabile da 1 a 3 ore dopo il ripristino della temperatura, il fuso può essere riassembleto, diminuendo le probabilità di insorgenza di anomalie cromosomiche (Rienzi et al., 2004).

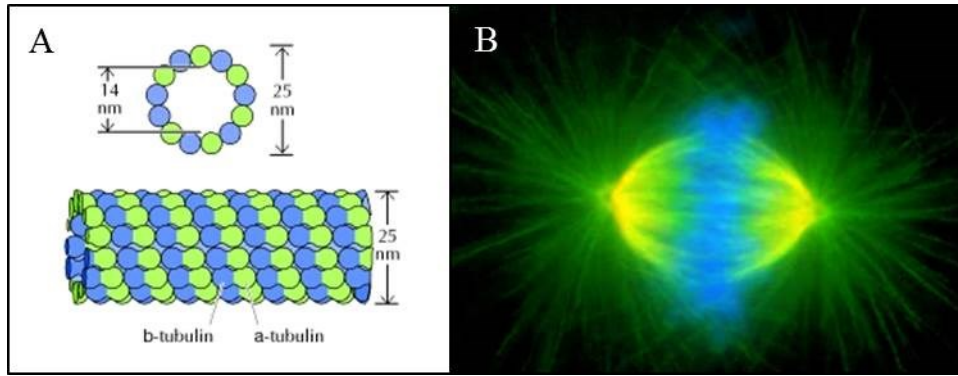


Fig 1.3: A) struttura di un microtubulo; B) Microtubuli (verde) del fuso meiotico; in blu sono visibili i cromosomi, allineati sulla piastra metafaseica. (Immagine da <http://principlesofproteinstructure.blogspot.it/2012/04/under-microscope-kinesin-motors-and.html>)

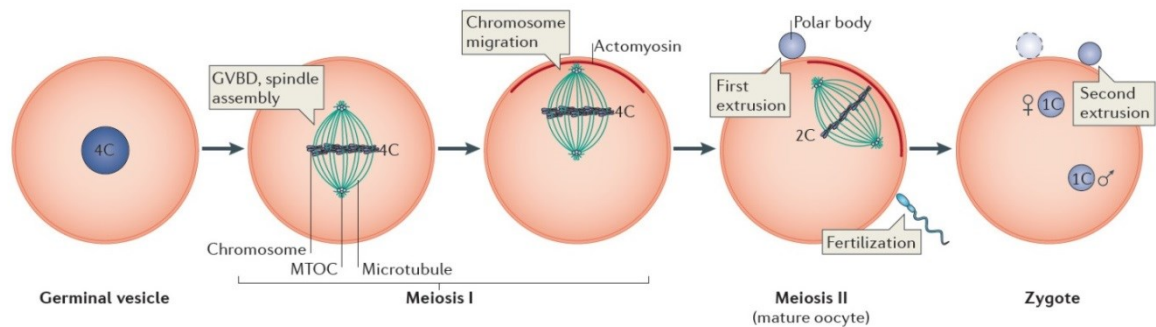


Fig 1.4: Passaggi fondamentali della maturazione nucleare. Il materiale genetico è inizialmente confinato nell'involucro nucleare (Germinal Vesicle, GV); la maturazione inizia con la rottura della vescicola germinale (Germinal Vesicle Break Down, GVBD). I cromosomi si organizzano nel fuso della metafase I e, dopo l'estruzione del primo globulo polare, si ha la formazione della metafase II (MII) (Li e Albertini, 2013).

- **Microfilamenti**

Una delle più abbondanti componenti citoscheletriche è costituita dai microfilamenti di actina. Essi si originano dall'avvolgimento elicoidale di due filamenti (F-actina) derivanti dalla polimerizzazione dell'actina globulare (G-actina). Il network di microfilamenti forma una rete tridimensionale nel citoplasma ovocitario ed esso si concentra particolarmente nella regione sottostante la membrana plasmatica. L'actina dell'ovocita è coinvolta in molteplici funzioni fisiologiche. Durante la maturazione, l'actina corticale è coinvolta nel processo di migrazione del fuso MI dalla regione centrale dell'ovocita verso la periferia (Longo e Chen, 1985). Sebbene l'esatta sequenza degli eventi con cui si presume che l'actina guidi la migrazione del fuso sia ancora oggetto di dibattito, si sa per certo che la comparsa dei cromosomi MI nella cellula induce l'attivazione dei complessi proteici ARP 2/3 (Actin related protein 2/3) e FMN2 (Formin2). Questi complessi sono dei nucleatori dell'actina e sono coinvolti nel movimento del fuso meiotico. In particolare, ARP 2/3 riveste un ruolo importante nella determinazione della polarità dell'ovocita (Deng et al., 2003). Infatti, l'avvicinamento dei cromosomi in MI verso la regione corticale, provoca l'attivazione del complesso ARP 2/3, che, a sua volta, induce il rimodellamento dell'actina corticale e la formazione di un dominio privo di microvilli, arricchito di actina e circondato da un anello di miosina II, che costituisce la regione in cui verrà estruso il corpo polare (Yi et al., 2012; Li et al., 2013). L'actina svolge un ruolo molto importante nella generazione di flussi intracellulari, che permettono il movimento di fluidi citosolici e particelle all'interno del gamete. Inizialmente, si riteneva che la generazione di questi flussi citoplasmatici riguardasse solo le uova di grandi dimensioni degli invertebrati, tuttavia recenti studi hanno scoperto che, in realtà, il processo è molto conservato e avviene anche i gameti di mammifero. La principale funzione attribuita alla presenza di questi flussi è quella di mantenere il fuso meiotico in posizione, in prossimità del cortex cellulare (Yi et al., 2011). Infatti, la direzione degli spostamenti dei fluidi è sempre

contraria alla posizione del fuso meiotico. A supporto di questa ipotesi, inoltre, vi è l'osservazione che la generazione dei flussi mediati dall'actina corticale inizia in concomitanza con la formazione del fuso MI e l'attivazione del complesso ARP 2/3 e si arrestano dopo la fecondazione, in seguito alla scomparsa del fuso (Ajduk et al., 2011).

Il coinvolgimento dell'actina corticale riveste fondamentale importanza durante la fecondazione. In primo luogo, essa è coinvolta nel meccanismo di estrusione dei granuli corticali per la difesa della polispermia (Becker et al., 1999). La presenza del nucleo dello spermatozoo nella regione subcorticale stimola, tramite un meccanismo di segnalazione mediato dalla cromatina, la formazione di una struttura ricca di acto-miosina, conosciuta come cono di fecondazione e necessaria per l'inglobamento e migrazione del nucleo dello spermatozoo (Deng et al., 2009). Infine, l'actina interviene nel processo di migrazione dei pronuclei (Simerly et al., 1995; Schatten et al., 1987).

Considerando i molteplici e cruciali eventi cellulari in cui sono coinvolti i microfilamenti, è semplice intuire che alterazioni di questa componente citoscheletrica può comportare conseguenze catastrofiche durante i processi di maturazione e fecondazione.

Molti studi hanno riportato che la crioconservazione e l'esposizione ai crioprotettori sono in grado di provocare la disorganizzazione del network di actina corticale (Saunders e Park, 1999; Kim et al., 2014; Basarab et al., 2008). Uno studio condotto da Wu et al., nel 2006, tramite microscopia elettronica ha evidenziato danneggiamenti a carico dell'actina filamentosa dell'ovocita di maiale, vitrificato sia allo stadio di MII che di GV. Gli autori hanno, inoltre, correlato la presenza delle modificazioni con ridotta competenza meiotica e ridotto sviluppo embrionale in seguito a fecondazione in vitro. Queste modificazioni sono state rilevabili anche tramite una diversa tecnica di analisi, costituita dalla microscopia confocale a fluorescenza (Rojas et al., 2004).

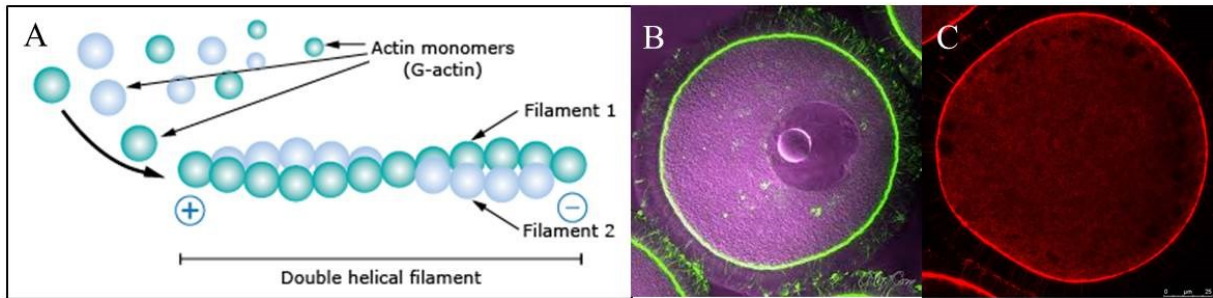


Fig 1.5: A) Struttura molecolare dei microfilamenti di actina: ciascun microfilamento di actina è costituito da due filamenti che si avvolgono l'uno sull'altro in maniera elicoidale; ogni filamento è costituito da monomeri di actina globulare (G-actina). Distribuzione dei microfilamenti di actina in un ovocita immaturo (GV) di topo (B) (Immagine da http://alpcan.com/index.php?view=detail&id=4684&option=com_joomgallery&Itemid=108) e in un ovocita maturo di ovino (C). C) Distribuzione dei microfilamenti di actina in un ovocita maturo di pecora.

1.2.2 Modificazioni dello stato ossido-riduttivo intracellulare

I mitocondri sono organelli citoplasmatici coinvolti nel metabolismo energetico della cellula, nel mantenimento dell'omeostasi e nella regolazione dell'apoptosi. Essi svolgono un ruolo centrale nell'attivazione del programma di morte cellulare, in quanto sono responsabili del rilascio di citocromo c nel citosol, necessario per le prime fasi di attivazione delle caspasi (Cohen, 1997). I mitocondri sono direttamente coinvolti nel processo riproduttivo, poiché la loro funzionalità influisce sulla qualità dell'ovocita, sulla sua capacità di essere fecondato e sulla competenza allo sviluppo. Disfunzioni e anomalie dei mitocondri sono associati a ridotto potenziale di sviluppo (Gualtieri et al., 2009). Nella specie suina, è stato dimostrato, tramite microscopia elettronica, che la vitrificazione altera il corretto pattern di distribuzione dei mitocondri. Infatti, in seguito al ripristino della temperatura, i mitocondri possono mostrare una differente re-distribuzione rispetto agli ovociti non crioconservati (Shi et al., 2007). Nell'uomo e nel topo è stato recentemente dimostrato che negli ovociti crioconservati il potenziale di membrana mitocondriale è ridotto rispetto al gruppo di controllo (Lei et al., 2014^o; Lei et al., 2014b). Poiché i mitocondri sono coinvolti nell'attivazione del programma di morte cellulare, alterazioni del potenziale di membrana causati dalla vitrificazione possono influire sull'instaurarsi di eventi apoptotici (Wallace et al., 1999). Alterazioni dell'attività mitocondriale indotta dalla vitrificazione possono contribuire all'incremento della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS sono radicali liberi prodotti durante le reazioni di ossido-riduzione cellulari. A basse concentrazioni, i ROS possono avere una funzione fisiologica e intervenire nei processi di regolazione delle attività cellulari, agendo come molecole segnale (Dalton et al., 1999). Normalmente, le cellule sono provviste di naturali sistemi di difesa antiossidante, che includono componenti enzimatiche e non, in grado di detossificare il citosol dalla presenza di questi radicali (Apel et al., 2004). Quando l'equilibrio tra produzione endogena di ROS e difesa antiossidante viene alterato, si instaura

una condizione nota come “stress ossidativo”. In questa situazione, la presenza costante di molecole radicaliche reattive induce inevitabilmente il danneggiamento ossidativo delle macromolecole biologiche, inclusi DNA, proteine e lipidi. La capacità della crioconservazione di indurre danno ossidativo nei tessuti è stata documentata già dal 1992 (Whiteley et al., 1992). Lo stress ossidativo è stato messo in relazione con un ridotto sviluppo embrionale e frammentazione dei blastomeri, nonché con l’attivazione del programma di morte cellulare negli embrioni e negli ovociti (Tarin et al., 2004; Dumollard et al., 2007). Nell’ovocita umano crioconservato tramite slow-cooling, è stato riportato un ridotto potenziale di membrana mitocondriale, correlabile con uno stato redox della cellula alterato (Jones et al., 2004), mentre nell’ovocita murino, è stato osservato l’aumento dei livelli di ROS in seguito a vitrificazione (Tatone et al., 2010). Nell’ovocita di suino, è stato visto che la crioconservazione induce l’aumento della concentrazione di perossido d’idrogeno e la diminuzione dei livelli di GSH (Somfai et al., 2007).

1.2.3 Alterazioni molecolari

Durante l'oogenesi, l'ovocita di mammifero accumula una grande quantità di mRNA di origine materna, che rappresentano una fonte indispensabile di informazioni essenziali per il corretto sviluppo embrionale (Farsi et al., 2013). I fenomeni trascrizionali e lo stoccaggio di questi mRNA materni avvengono nell'ovocita durante la crescita follicolare e cessano quando l'ovocita raggiunge lo stadio di GV. Lo zigote, nelle prime divisioni, dipende esclusivamente dagli mRNA stoccati di origine materna fino all'attivazione del genoma embrionario.

Negli ultimi tempi l'interesse verso indagini molecolari mirate all'analisi dei pattern di espressione genica degli ovociti ha attirato sempre più l'attenzione dei ricercatori e, il suo utilizzo sta ampliando notevolmente gli orizzonti per individuare marker che riflettano la qualità dell'ovocita.

Numerosi studi hanno evidenziato che la crioconservazione può determinare una modificazione dei profili di espressione genica dell'ovocita. Molti di questi lavori sono stati condotti su specie animali, e riportano che la crioconservazione altera principalmente l'espressione di geni coinvolti nello stress ossidativo, come la famiglia delle proteine Heat Shock e Superossido Dismutasi 1, nella regolazione dell'apoptosi, come i membri della famiglia delle BCL2, e nella regolazione del ciclo cellulare, come ciclina B, CDK1, Hook1 e Kif11 (Liu et al., 2003; Lee et al., 2008; Succu et al., 2008; Isachenko et al., 2009; Anchamparuthy et al., 2010; Habibi et al., 2010; Turathum et al., 2010; Chamayou et al., 2011). Inoltre, analisi proteomiche sull'ovocita maturo di topo hanno indicato che maggiori alterazioni sulla fisiologia ovocitaria vengo indotte maggiormente in seguito a crioconservazione tramite congelamento lento, rispetto alla vitrificazione (Larman et al., 2007; Katz-Jaffe et al., 2008).

1.2.4 Effetti sull'omeostasi del calcio

Lo ione calcio Ca^{2+} è fisiologicamente utilizzato dalle cellule come secondo messaggero, e nell'ovocita è svolge un ruolo fondamentale durante il processo di fecondazione. Normalmente, il primo effetto della fusione dello spermatozoo con la membrana dell'ovocita è l'innalzamento dei livelli intracellulari di ioni Ca^{2+} (Lawrence et al., 1997), provenienti sia dalle riserve interne del reticolo endoplasmatico, sia dall'ambiente extracellulare (Shiina et al., 1993). L'aumento dei livelli di calcio intracellulari agisce come segnalazione per la ripresa della meiosi ed è stato dimostrato che i crioprotettori di uso comune, come DMSO, EG e 1,2-propandiolo (PROH), sono in grado di indurre favorire l'ingresso dello ione nei citoplasma. La prima conseguenza è che, l'instaurarsi di un segnale simile a quello indotto dalla penetrazione dello spermatozoo, può indurre determinare l'attivazione partenogenetica spontanea (Tian et al., 2007). La progressione meiotica è regolata dall'attività del Fattore che Promuove la Maturazione (MPF), che interviene nella regolazione della mitosi e della meiosi. Questo fattore è costituito da serina/treonina protein chinasi, la chinasi 1 ciclina dipendente 1 (CDK1 o P34) e dalla sua subunità catalitica, la ciclina B (Gautier et al., 1990). L'attività dell'MPF è controllata dall'associazione della CDK1 con la ciclina B2 con formazione del complesso pre-MPF. Esso viene attivato successivamente dalla specifica defosforilazione di CDK1 operata dalla fosfatasi cdc25 (Lewin et al., 1990). L'attività dell'MPF è alta durante lo stadio di metafase e la sua inattivazione è necessaria per la transizione metafase/anafase. L'ingresso intracellulare induce indirettamente la degradazione della ciclina B, portando all'indattivazione del complesso. La seconda conseguenza dell'aumento dei livelli di calcio è l'induzione della fusione precoce dei granuli corticali con l'oolemma, con conseguente indurimento della zona pellucida (Kline and Kline, 1992). Ne deriva che ovociti sottoposti a criocorservazione sono difficilmente fertilizzabili tramite fecondazione in vitro (Tian et al., 2007). Tuttavia, la messa a punto dell'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI)

può consentire di superare la barriera costituita dalla zona indurita (Porcu et al., 2000).

1.3 STRATEGIE DI MIGLIORAMENTO

1.3.1 Stadio meiotico

La scelta dello stadio meiotico ideale per la procedura di crioconservazione è, attualmente, ancora oggetto di discussione. Ad oggi, la maggior parte degli studi prendono in considerazione l'utilizzo dello stadio meiotico di metafase II, ma crescente interesse è rivolto alla possibilità di crioconservare l'ovocita immaturo. Da un punto di vista applicativo, l'utilizzo dell'ovocita immaturo, successivamente maturato in vitro, potrebbe rivestire particolare interesse nel campo della PMA. Infatti, negli attuali protocolli standard dei cicli di IVF, la donna è sottoposta ad ampi trattamenti ormonali, a cui possono essere associati effetti collaterali, come la sindrome di iperstimolazione ovarica (Seyhan et al., 2013). La crioconservazione dell'ovocita maturato in vivo, non può essere utilizzato come strategia di preservazione della fertilità nelle pazienti oncologiche con tumori sensibili agli ormoni, come il cancro al seno, e di conseguenza, la crioconservazione dell'ovocita immaturo potrebbe essere considerata una valida alternativa. Altro vantaggio dall'utilizzo dell'ovocita maturo, potrebbe risiedere nelle sue caratteristiche nucleari, che offrono potenzialmente la possibilità di ridurre gli effetti deleteri che si verificano in seguito alla crioconservazione dell'ovocita maturo. A questo stadio, infatti, l'ovocita ha già completato le fasi di maturazione nucleare e citoplasmatica e i cromosomi sono condensati e allineati lungo la piastra metafasica, all'interno del fuso meiotico. Come descritto in maniera più dettagliata nel paragrafo 1.2.1, la vitrificazione dell'ovocita maturo è spesso accompagnata da modificazioni che riguardano le componenti citoscheletriche, con particolare riferimento alla depolimerizzazione dei microtubuli del fuso meiotico che può determinare incrementi delle aberrazioni cromosomiche (Larman et al., 2007; Gomes et al., 2008; Boiso et al., 2002; Kola et al., 1988). Nell'ovocita in immaturo allo stadio di vescicola germinale (GV), questa tipologia di danneggiamento potrebbe essere bypassato, in quanto, il fuso meiotico non è ancora stato

assemblato e i cromosomi sono despiralizzati sono protetti all'interno dell'involucro nucleare. Tuttavia, la vitrificazione a questo stadio meiotico non ha avuto, finora, un alto tasso di successo. E' stato, infatti, dimostrato, che l'ovocita immaturo è sensibile alla crioconservazione tanto quanto l'ovocita maturo. Sono stati riportati, infatti, danneggiamenti ultrastrutturali che hanno riguardato cromatina, mitocondri e involucro nucleare (Van Blerkom, 1989). La presenza delle cellule del cumulo attorno all'ovocita immaturo gioca un ruolo cruciale nel processo di maturazione (Li et al., 2013) e il danneggiamento delle connessioni che si instaurano tra le due componenti possono tradursi nella ridotta competenza meiotico dell'ovocita (Bogliolo et al., 2007). In uno studio sull'ovocita di ratto, è stato dimostrato che la vitrificazione può danneggiare sia le cellule del cumulo sia le fibre transzonali che mediano la comunicazione cumulo-ovocita. Lo studio ha, inoltre, evidenziato che negli ovociti vitrificati è presente una mancanza di coordinazione tra maturazione citoplasmatica e nucleare (Kim et al., 2014). Sebbene la vitrificazione in GV possa rappresentare teoricamente una strategia vantaggiosa, allo stato attuale quella dell'ovocita in MII ha ancora un'efficienza nettamente superiore (Clark et al., 2013). Pertanto nuove strategie devono essere sviluppate per migliorare la crioconservazione dell'ovocita immaturo.

E' stato suggerito che il fuso meiotico dell'ovocita in telofase I (TI) abbia una minore sensibilità al raffreddamento rispetto all'MII (Parmegiani et al., 2009). Tuttavia, dal momento che nell'ovocita TI il globulo polare è in via di formazione, può esserci lo svantaggio che, tramite la classica microscopia ottica, non è possibile riuscire ad individuare esattamente il momento in cui il gamete raggiunge questo stadio, a meno che non si ricorra all'utilizzo della microscopia a luce polarizzata. Ben poco si conosce circa l'efficienza della vitrificazione degli ovociti allo stadio di metafase I e anafase I.

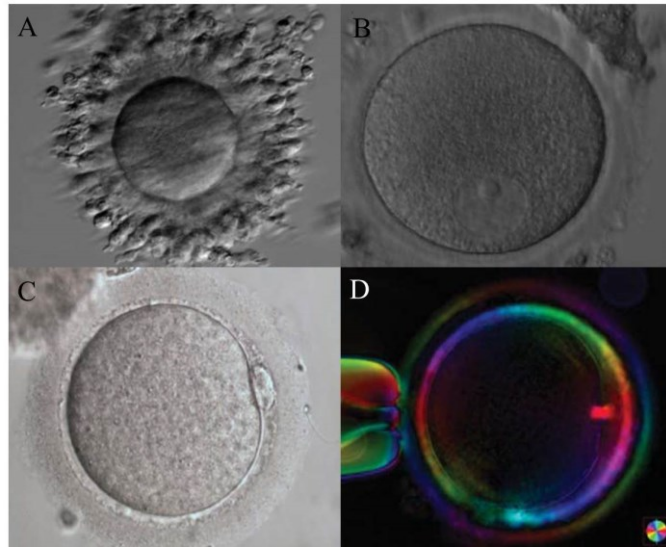


Fig. 1.6: Ovociti umani in diversi stadi meiotici: A-B) vescicola germinale (GV); C) metafase II (MII); D) Telofase I (TI) visualizzata in microscopia a luce polarizzata (Immagini da Rienzi et al., 2012)

1.3.2 Esposizione ai CPA e composizione dei medium

Una delle prime strategie per l'ottimizzazione della vitrificazione è stata quella di cercare il giusto compromesso tra il tempo di esposizione ai crioprotettori e la loro concentrazione. Le miscele di CPA utilizzate per la vitrificazione sono estremamente variabili e possono essere composte da combinazione di CPA vari, penetranti e non. L'efficacia dei CPA dipende anche dalla specie considerata, in quanto le caratteristiche intrinseche di ciascun ovocita, come, ad esempio, il contenuto differente di lipidi o la diversa permeabilità della membrana, possono rendere la cellula più o meno sensibile al freddo e allo stress osmotico.

Affinché si verifichi il processo fisico di vitrificazione, la soluzione in cui vengono immersi gli ovociti deve essere particolarmente viscosa. Di conseguenza, durante l'ingresso dei CPA nella cellula e durante la loro rimozione, il volume cellulare varia e l'acqua si sposta all'esterno e all'interno della cellula, in risposta a gradienti osmotici e chimici. Questi cambiamenti del volume cellulare, legati alle variazioni della pressione osmotica, possono compromettere la vitalità della cellula (Williams et al., 1980).

Per ridurre gli stress osmotici, l'approccio comunemente utilizzato è quello di evitare di immergere l'ovocita direttamente nella soluzione finale di vitrificazione, ad elevata concentrazione di CPA, ma di esporre il gamete in più step, solitamente due, a concentrazioni intermedie di crioprotettori. In questo modo, l'equilibratura può avvenire in più riprese, rendendo il processo meno drastico per la cellula. E' stato dimostrato che più questo processo è graduale, aumentando il numero di step di equilibratura, e maggiore è il tasso di sopravvivenza delle cellule (Kuwayama et al., 1994). Heo et al., nel 2011, hanno studiato la messo a punto un sistema in microfluidica, in cui l'ovocita è fermo, mentre un flusso di crioprotettori, che aumenta gradualmente in concentrazione, è fatto fluire nel sistema attraverso una regolazione automatizzata, dimostrando che, in questo modo, il volume cellulare subisce delle variazioni minori, consentendo miglior efficienza in termini di

sopravvivenza.

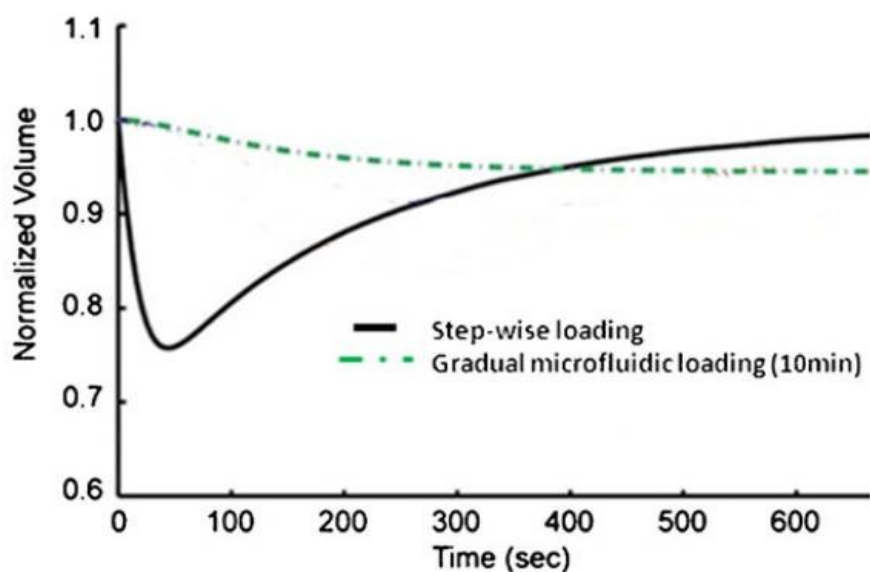


Fig 1.7: Variazioni del volume dell'ovocita durante l'esposizione ai crioprotettori. La linea continua indica la variazione del volume quando l'esposizione ai crioprotettori è condotta tramite un sistema multistep; la linea tratteggiata è riferita alle variazioni di volume durante l'esposizione nel microsistema, con flusso di crioprotettori regolato in maniera automatizzata (Heo et al., 2011).

Sebbene la riuscita della vitrificazione sia maggiormente attribuibile alla combinazione di crioprotettori, tempo di esposizione e supporto utilizzato, non si deve tralasciare l'influenza del medium base in cui i CPA sono disciolti. La vitrificazione viene condotta in atmosfera normale, perciò una variabile da limitare è il pH. E' perciò utile l'utilizzo di un medium che consenta di tamponare il medium durante tutte le fasi della procedura. Altro fattore da considerare è il contenuto di metaboliti. Per esempio, è stato dimostrato che l'aumento della glicina nella soluzione di vitrificazione può avere degli effetti positivi sulla competenza ovocitaria e sulla funzione mitocondriale (Zander-Fox et al., 2013) ed effetti positivi sono stati descritti sulla sostituzione del cloruro di sodio con la colina (Stachecki et al., 1998). Inoltre, è stato dimostrato che, eliminando lo ione calcio dal medium di base, si può diminuire l'induzione del rilascio precoce dei granuli corticali e il conseguente fenomeno di Zona

Hardening (Larman et al., 2008; Succu et al., 2011).

1.3.3 Stabilizzatori del citoscheletro

L'esposizione ai crioprotettori sottopone la cellula ad un notevole stress osmotico. La cellula deve essere in grado di rispondere prontamente alle sollecitazioni e ai cambiamenti di volume. Il citoscheletro è responsabile del mantenimento della struttura cellulare e della formazione del fuso meiotico, perciò l'interesse della ricerca è rivolto verso strategie che consentano di preservarlo.

La citocalasina B è una micotossina che può essere utilizzata per “rilassare” il citoscheletro di actina, poiché è in grado di inibire la sintesi dei microfilamenti, rendendo le strutture citoplasmatiche meno rigide (Fujihira et al., 2004). Zhang et al., nel 2009, hanno testato l'effetto della citocalasina B durante la vitrificazione dell'ovocita ovino, dimostrando che, sebbene l'utilizzo di questa sostanza non abbia effetto nel migliorare il tasso di sopravvivenza degli ovociti, essa può incrementare il tasso di sviluppo a blastocisti, rispetto agli ovociti vitrificati senza stabilizzatore. Effetti positivi dell'utilizzo della citocalasina B sull'integrità dei microtubuli sono stati riportati nell'ovocita bovino (Rho et al., 2002) e nell'ovocita suino (Fujihira et al., 2004). Tuttavia, la reale efficacia dell'impiego della citocalasina B durante la crioconservazione è ancora controversa. Sono stati, infatti, riportati casi in cui il suo impiego non ha avuto alcun effetto (Marco-Jimenez et al., 2012; Silvestre et al., 2006) o ha avuto effetti deleteri (Jiménez-Trigos et al., 2013).

Il tassolo è una tossina di origine vegetale in grado di interagire con i microtubuli cellulari, favorendone la polimerizzazione e rendendoli altamente stabili (Mailhes et al., 1999). Per questa sua caratteristica, il tassolo è stato utilizzato nel tentativo di stabilizzare il fuso meiotico durante la crioconservazione. Nell'ovocita suino, è stato visto che il trattamento con tassolo prima della vitrificazione può aumentare la percentuale di ovociti in grado di raggiungere lo stadio di blastocisti dopo attivazione partenogenetica (Ogawa et al., 2010).

Nell'ovocita di topo, è stato visto che l'utilizzo del tassolo prima della vitrificazione aumenta la percentuale di sviluppo a blastocisti e riduce le alterazioni a carico della distribuzione dei mitocondri indotte dalla vitrificazione (Yan et al., 2010). Risultati simili sono stati ottenuti anche durante la vitrificazione dell'ovocita bovino (Morato et al., 2008).

La latrunculina-A è una tossina proveniente da spugne marine in grado di provocare la depolimerizzazione dell'actina. Il suo meccanismo d'azione è dovuto alla sua capacità di legarsi reversibilmente all'actina globulare (Yarmola et al., 2000). Utilizzando l'ovocita di topo, Hosu e colleghi (2008) hanno dimostrato che la crioconservazione altera sensibilmente la viscoelasticità del citoplasma. Tuttavia, depolimerizzando reversibilmente il network di actina prima della vitrificazione, è possibile avere un effetto protettivo sulle normali proprietà viscoelastiche dell'ovocita, favorendo un alto tasso di sopravvivenza post-scongelo e un incremento della competenza di sviluppo dell'ovocita.

1.3.4 Antiossidanti

Uno degli effetti negativi della crioconservazione è l'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Queste molecole estremamente instabili tendono ad ossidare le molecole biologiche, danneggiando DNA e proteine, e scatenando eventi di perossidazione lipidica a carico delle membrane cellulari. La crescente conoscenza dell'attività biologica di molecole antiossidanti, apre la strada per il loro possibile impiego nel limitare i danni da ROS durante la vitrificazione.

Un recente studio ha riportato gli effetti benefici dell'utilizzo del resveratrolo durante la vitrificazione dell'ovocita di suino. Questa molecola è presente in comuni alimenti di origine vegetale e sono ben note le sue proprietà scavenger. L'aggiunta del resveratrolo nelle soluzioni di vitrificazione è in grado di aumentare la resistenza dell'ovocita alla crioconservazione e di ridurre la percentuale di ovociti in cui si attiva il programma di morte cellulare (Giaretta et al., 2013).

Il β -mercaptoetanolo è una molecola tiolica a basso peso molecolare, in grado di contrastare lo stress ossidativo. Nel maiale, è stato suggerito che l'aggiunta di β -mercaptoetanolo può ridurre sensibilmente la concentrazione di ROS generati durante la vitrificazione, con conseguenti effetti benefici sullo sviluppo embrionale (Gupta et al., 2010).

1.3.5 Sviluppo di tecniche di analisi non invasive

I criteri di valutazione attualmente applicati per analizzare la qualità dell' ovocita crioconservato comprendono una serie di indagini invasive e non-invasive. Tuttavia, tali criteri non sono ancora completamente definiti e non permettono la valutazione globale dello stato dell'ovocita dopo la crioconservazione e la standardizzazione di appropriati marker di qualità. Molte di queste indagini richiedono l'utilizzo di fluorocromi o sostanze chimiche di contrasto che permettono l'osservazione di poche componenti cellulari per singola analisi. La messa a punto di nuovi criteri per la valutazione dei danni indotti dal trattamento ipotermico sul gamete femminile e lo sviluppo di strategie innovative per limitare tali effetti potrebbe permettere la standardizzazione di sistemi diagnostici per la valutazione dello status strutturale e molecolare dell'ovocita vitrificato.

La messa a punto del microscopio a luce polarizzata ha fornito uno strumento per effettuare valutazioni non invasive del fuso meiotico, consentendo la possibilità di seguire eventi mitotici e meiotici in cellule vitali e fornendo uno strumento standardizzato per la valutazione delle alterazioni a carico del fuso nell'ovocita crioconservato in campo umano (Rienzi et al., 2004) e in campo veterinario (Caamano et al., 2013). Tuttavia, il limite di questa tecnica risiede nella mancata possibilità di fornire informazioni relative ad aspetti biochimico-molecolari dell'ovocita.

Microspettroscopia Raman

La Microspettroscopia Raman (RMS) si è rivelata negli ultimi anni un'importante tecnica non invasiva per lo studio della composizione cellulare e delle modificazioni biologiche (Swain et al., 2010). Il principio della tecnica è legato allo scattering inelastico dei fotoni, che si verifica quando una luce monocromatica viene indirizzata sul campione. Le informazioni contenute negli spettri riflettono la tipologia di molecole incontrate dal fascio luminoso e, pertanto, essi forniscono informazioni sulla composizione biochimico-molecolare del campione analizzato. La possibilità di utilizzare luci incidenti a bassissima potenza, consentono di analizzare in vivo cellule e tessuti in ambiente acquoso, senza l'utilizzo di alcuna marcatura.

Gli aspetti che sono stati investigati finora sono molteplici, e vanno dallo studio di proteine (Zhang et al., 2009; Jurasekova et al., 2011), alla ricerca di particolari molecole in cellule e tessuti, come i carotenoidi (Ermakov et al., 2005; Rusciano et al., 2009), nonché applicazioni allo studio della differenziazione cellulare (Shulze et al., 2010; Pascut et al., 2011), delle cellule tumorali (Jess et al., 2007; Brozek-Pluska et al., 2011) e delle modificazioni indotte da stress ossidativo (Krafft et al., 2006; Zachariah et al., 2010; Jurasekova et al., 2011). In campo riproduttivo, la tecnica è già stata applicata con successo per lo studio della composizione molecolare dipendente dallo stadio meiotico (Wood et al., 2008; Davidson et al., 2013) e per mappare la redistribuzione delle componenti molecolari durante la maturazione dell'ovocita e dello sviluppo embrionale (Davidson et al., 2012). Inoltre, la RMS è stata applicata con successo allo studio delle modificazioni indotte nell'ovocita dallo stress ossidativo legato all'invecchiamento (Bogliolo et al., 2013) e delle modificazioni che avvengono a livello della zona pellucida in seguito a vitrificazione (Bogliolo et al., 2012).

1.4 VITRIFICAZIONE DELL'OVOCITA OVINO

1.4.1 Vittrificazione dell'ovocita maturo

Nella specie ovina sono stati condotti numerosi studi, ma, nonostante siano state testate varie combinazioni di crioprotettori, diversi tempi di esposizione e molti supporti, l'efficienza della vittrificazione non ha ancora raggiunto livelli soddisfacenti.

Succu et al., nel 2007a, hanno testato l'efficacia di cryotop, cryoloop e open pulled straw (OPS) per la vittrificazione di ovociti maturati in vitro, utilizzando i crioprotettori EG e DMSO (Tabella 2.1). In questo lavoro, oltre alla riduzione della vitalità dopo lo scongelamento, è stato riportato un elevato tasso di aberrazioni cromosomiche e anomalie del fuso meiotico. L'elevata sensibilità dell'apparato meiotico dell'ovocita ovino è stata evidenziata, successivamente, anche da Asgari e colleghi, che, nel 2011 e nel 2012, hanno riportato elevati tassi di anomalie a carico dell'apparato meiotico degli ovociti vittrificati. Lo stesso risultato è stato osservato anche in seguito alla vittrificazione dell'ovocita MII di soggetti prepuberi (Succu et al., 2007b).

Molti dei lavori sulla vittrificazione della MII di ovino hanno descritto il fenomeno di attivazione partenogenetica spontanea in seguito a vittrificazione/scongelamento. Succu et al., (2007a) hanno riportato alte percentuali di attivazione in seguito all'esposizione ai crioprotettori e vittrificazione. Gli autori hanno ipotizzato che l'attivazione partenogenetica spontanea può essere ricondotta all'abbassamento dei livelli di MPF (Maturation Promoting Factor) e al concomitante incremento di Ca^{2+} nella cellula, indotto dai crioprotettori. Qualche anno dopo, infatti, gli stessi autori hanno dimostrato che l'utilizzo di soluzioni di vittrificazione prive di ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} può ridurre sensibilmente le percentuali di attivazione spontanea (Succu et al., 2011). Nel 2007, anche Tian et al. hanno descritto altissime percentuali di attivazione partenogenetica spontanea in seguito a esposizione ai CPA e vittrificazione. Dallo studio, inoltre, è stato dimostrato che questi ovociti sono difficilmente

fecondabili in vitro, a causa del precoce rilascio dei granuli corticali e il conseguente fenomeno di Zona Hardening. Nel 2011 e nel 2012, anche Asgari et al. hanno riportato il fenomeno di attivazione spontanea.

Nella specie ovina, è stato più volte descritto che gli ovociti MII vitrificati sono caratterizzati da un basso potenziale di sviluppo. Nel lavoro di Succu et al., (2007a), è stato riportato un tasso di sviluppo a blastocisti pari a zero, utilizzando il cryotop e l'open pulled straw come supporto di vitrificazione, mentre un risultato lievemente migliore è stato ottenuto utilizzando il cryoloop. Analogo fallimento nella produzione di blastocisti è stato riportato dagli stessi autori nel 2007b, in seguito a fertilizzazione in vitro di ovociti di agnella vitrificati e, nel 2008, utilizzando soluzioni di vitrificazione differenti. Risultati simili sono stati riportati anche da Zhang et al., (2009), Berlinguer et al., (2007), Succu et al., (2011), Hosseini et al. (2012) e Shirazi et al. (2014). Probabilmente, come osservato da Tian et al., (2007), una delle cause del ridotto sviluppo embrionale potrebbe essere legata alla ridotta capacità degli spermatozoi di fecondare gli ovociti ovini vitrificati o esposti ai crioprotettori. Un risultato migliore, tuttavia, è stato ottenuto nello studio di Asgari et al. (2011), in cui, in seguito ad attivazione partenogenetica, lo sviluppo a blastocisti è stato comparabile al gruppo controllo.

Alcuni degli studi presenti in letteratura si sono focalizzati sul miglioramento dell'efficienza della vitrificazione dell'ovocita MII. Berlinguer et al., (2007) hanno testato l'effetto della co-incubazione con trealosio durante la maturazione dell'ovocita di prepubere prima della vitrificazione. Sebbene la maturazione dell'ovocita in presenza di trealosio non abbia migliorato l'outcome in seguito a fertilizzazione in vitro, gli autori hanno riportato un effetto protettivo del disaccaride sulle membrane, migliorando il tasso di sopravvivenza allo scongelamento.

Zhang et al (2009) e Shirazi et al., (2014) hanno studiato l'effetto della presenza delle cellule del cumulo attorno all'ovocita maturo durante la vitrificazione. Nel primo caso, la presenza

delle cellule del cumulo non ha avuto effetti nel migliorare le percentuali di vitalità post-warming e di sviluppo embrionale. Tuttavia, Shirazi et al. (2014) hanno riportato un lieve effetto migliorativo in termini di cleavage e sviluppo a blastocisti, mentre non sono stati osservati effetti sulle percentuali di sopravvivenza allo scongelamento.

Negli stessi due lavori, è stato anche testato anche l'effetto della preincubazione con stabilizzatori del citoscheletro, prima della vitrificazione. Nel lavoro di Zhang et al., (2009), la preincubazione con CB o con Tassolo non ha avuto effetti sul miglioramento delle percentuali di sopravvivenza allo scongelamento, mentre è stato osservato un leggero aumento nelle percentuali di produzione di blastocisti. In accordo con quanto trovato da Zhang et al. (2009), anche Shirazi et al. (2014) non hanno riportato effetti benefici del pretrattamento con citocalasina B sulla sopravvivenza. Tuttavia, in questo lavoro sono stati riportati anche effetti negativi sullo sviluppo embrionale.

	Stadio Meiotico	CONCENTRAZIONI DI CRIOPROTETTORI	SUPPORTO
Succu et al., 2007a	MII Adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 3 Min; SOL2: EG + DMSO (16,5% + 16,5%) + 0,5 M Saccarosio x 20 sec	Cryotop; Cryoloop; OPS
Succu et al., 2007b	MII prepubere	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 3 Min; SOL2: EG + DMSO (16,5% + 16,5%) + 0,5 M Saccarosio x 20 sec	Cryoloop
Tian et al., 2007	MII Adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) + Saccarosio 0.3 M x 30 sec; SOL2: EG + DMSO (15% + 15%) + 18% Ficoll + Saccarosio 0,3 M x 25 sec.	Open pulled straw
Berlinguer et al., 2007	MII prepubere	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 3 Min; SOL2: EG + DMSO (16,5% + 16,5%) + 0,5 M Saccarosio x 20 sec	Cryoloop
Succu et al., 2008	MII Adulto	SOL1: EG + DMSO (10% + 10%) x 30 sec; SOL2: EG + DMSO (20% + 20%) + 0,5 M Saccarosio x 20 sec	Cryotop
Zhang et al., 2009	MII Adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 3 min; SOL2: EG + DMSO (20% + 20%) + 0,5 M Saccarosio x 20-30 sec	Solid Surface Vitrification (SSV)
Asgari et al., 2011	MII Adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 3 min in maniera graduale; SOL2: EG + DMSO (15% + 15%) + x 20-30 sec Medium senza Ca e Mg	Cryotop
Succu et al., 2011	MII adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 3 Min; SOL2: EG + DMSO (16,5% + 16,5%) + 0,5 M Saccarosio x 20 sec	Cryotop
Hosseini et al., 2012	MII adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 3 min in maniera graduale; SOL2: EG + DMSO (15% + 15%) + x 20-30 sec Medium senza Ca e Mg	Cryotop
Asgari et al., 2012	MII Adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 3 min in maniera graduale; SOL2: EG + DMSO (15% + 15%) + x 20-30 sec Medium senza Ca e Mg	Cryotop
Shirazi et al., 2014	MII adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 5/7/10 Min; SOL2: EG + DMSO (15% + 15%) + 0,5 M Saccarosio x 45 sec	Hemi-straw

TAB 1.1: Principali protocolli impiegati per la vitrificazione dell'ovocita di pecora adulta e prepubere allo stadio di metafase II.

1.4.2 Vittrificazione dell'ovocita immaturo

Molti autori hanno focalizzato i loro studi sulla vittrificazione dell'ovocita immaturo, crioconservato come complesso cumulo-ovocita (COC), ma i risultati, ad oggi, mostrano che nella specie ovina essa mostra una bassa efficienza.

La riduzione della sopravvivenza in seguito alla vittrificazione è stata più volte riportata (Bogliolo et al., 2007; Ebrahimi et al. 2010a, 2010b; Bhat et al., 2014). Infatti, come l'ovocita MII, anche quello vittrificato allo stadio di GV sembra essere particolarmente sensibile ai crioprotettori e al raffreddamento. Rispetto agli ovociti freschi, gli ovociti vittrificati ed esposti ai crioprotettori hanno mostrato maggiori percentuali di degenerazione in seguito alla maturazione in vitro (Ebrahimi et al., 2010a, 2010b; Moawad et al., 2012; Fernandez-Reyez et al., 2012).

Una delle più grandi difficoltà della vittrificazione dell'ovocita allo stadio di GV è stata quella di preservare la competenza meiotica in seguito al ripristino della temperatura e alla maturazione in vitro. Infatti, molto spesso è stato descritto che le percentuali di maturazione sono state drasticamente ridotte negli ovociti crioconservati (Isachenko et al., 2001; Silvestre et al., 2006; Bogliolo et al., 2007; Fernandez-Reyez et al., 2012; Moawad et al., 2012). Inoltre, analizzando la struttura delle metafasi II, sono stati osservati elevati tassi di aberrazioni cromosomiche e anomalie a carico del fuso meiotico (Bogliolo et al., 2007; Ebrahimi et al., 2010a). Percentuali di maturazione comparabili al controllo fresco sono stati riportati solo da Ebrahimi et al., (2010a, 2010b) e Moawad et al., (2013a). La riduzione della competenza meiotica e la bassa qualità degli ovociti maturi, potrebbe essere influenzata da alterazioni che avvengono a carico delle giunzioni tra cellule del cumulo e ovocita. Bogliolo et al., nel 2007, infatti, utilizzando la luciferina, hanno descritto la presenza di una riduzione dell'accoppiamento funzionale tra ovocita e cellule del cumulo in seguito alla crioconservazione. Inoltre, Moawad e colleghi, (2012 e 2013a), hanno descritto che, in

seguito alla maturazione in vitro, gli ovociti vitrificati ed esposti ai crioprotettori presentano una riduzione nel grado di espansione delle cellule del cumulo.

E' stato riportato gli ovociti vitrificati ed esposti ai crioprotettori mostrano minor competenza nel raggiungere lo stadio di blastocisti in seguito a fertilizzazione (Fernandez-Reyez, 2012; Moawad et al., 2012; Bhat et al., 2014). Tuttavia, Moawad et al., 2013a, hanno riportato dei risultati più incoraggianti, in quanto, in seguito ad IVF, gli autori hanno ottenuto percentuali di sviluppo a blastocisti comparabili con il controllo.

Tentativi di migliorare l'outcome della vitrificazione del complesso cumulo-ovocita sono stati effettuati utilizzando lo stabilizzatore del citoscheletro citocalasina B (CB). Nel 2007, Bogliolo et al., hanno riportato che il pre-trattamento degli ovociti con CB ha un esito negativo sulla sopravvivenza post-warming. Nello stesso lavoro gli autori hanno studiato anche le conseguenze della rimozione delle cellule del cumulo prima della vitrificazione, descrivendo un effetto positivo della rimozione del cumulo a 0h sulla sopravvivenza, ma al contempo, conseguenze negative sulla competenza meiotica. Nel 2014, Shirazi et al. hanno confermato quanto osservato da Bogliolo et al., (2007), descrivendo l'assenza di effetti benefici del pretrattamento con CB sulla sopravvivenza, in aggiunta a effetti deleteri sullo sviluppo embrionale. Nessun effetto su sopravvivenza, fertilizzazione e sviluppo a blastocisti è stato riportato da Moawad et al., (2013b) e da Silvestre et al (2006).

	STADIO MEIOTICO	CRIOPROTETTORI	SUPPORTO
Isachenko et al., 2001	GV Adulto	SOL 1: EG (40%) + Saccarosio 0,75 M x 1 min	OPS-Superfine OPS
Silvestre et al., 2006	GV Prepubere	SOL1: EG + DMSO (10% + 10%) x 30 sec; SOL2: EG + DMSO (20% + 20%) + Saccarosio 0,25 M x 1 min.	OPS
Bogliolo et al., 2007	GV Adulto	SOL1: EG + DMSO (10% + 10%) x 30 sec; SOL2: EG + DMSO (20% + 20%) + 0,5 M Saccarosio x 20 sec	Cryotop
Shirazi et al., 2014	GV Adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 5/7/10 Min; SOL2: EG + DMSO (15% + 15%) + 0,5 M Saccarosio x 45 sec	Hemi-straw
Ebrahimi et al., 2010a	GV Adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 10-15 Min; SOL2: EG + DMSO (15% + 15%) + 0,5 M Saccarosio x 1 min	Cryotop
Ebrahimi et al., 2010b	GV Adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 10-15 Min; SOL2: EG + DMSO (15% + 15%) + 0,5 M Saccarosio x 1 min	Cryotop Conventional straw SSV
Ebrahimi et al., 2011	GV Adulto	SOL1: EG + DMSO (7,5% + 7,5%) x 10-15 Min; SOL2: EG + DMSO (15% + 15%) + 0,5 M Saccarosio x 1 min	Cryotop Conventional straw SSV
Moawad et al., 2012	GV Adulto	SOL1: EG (4%) x 6-10 Min; SOL2: EG (35%) + 5% PVP + 0,4 M Trealosio x 60 sec	Solid Surface Vitrification
Fernandez-Reyez et al., 2012	GV Adulto	SOL1: EG (4%) x 15 Min; SOL2: EG (35%) + 0,4 M Trealosio x 20 sec	Modified Hemi- straw OPS-superfine Cryotop
Moawad et al., 2013ab	GV Adulto	SOL1: EG (10%) + 0,25 M Trealosio x 3 Min; SOL2: EG (20%) + DMSO (20%) x <1 Min.	Cryloop
Bhat et al., 2014	GV Adulto	SOL1: EG (varie concentrazioni) x 5 min SOL2: EG + DMSO (varie concentrazioni) +0,4 M Sacc x 20 sec	OPS

TAB 1.2 Principali protocolli impiegati per la vitrificazione dell'ovocita di pecora adulta e prepubere allo stadio di vescicola germinale.

1.4.3 Vittrificazione dell'ovocita di animali prepuberi

La crioconservazione del materiale germinale femminile proveniente da soggetti prepuberi presenta aspetti applicativi in entrambi i campi animale e umano. In campo umano, la crioconservazione del tessuto ovarico riveste notevole importanza per preservare la fertilità in pazienti oncologiche in età pediatrica. Rispetto alla donna, le opzioni per preservare la fertilità in questa categoria di pazienti presentano delle limitazioni, in quanto la crioconservazione di ovociti ed embrioni non possono essere considerata. La crioconservazione di frammenti di corticale ovarica, prelevati tramite laparoscopia, tuttavia, offre una valida alternativa per la tutela della fertilità delle pazienti prepuberi, con possibilità di essere successivamente reimpiantate e indirizzate alla produzione di gameti (Donnez et al., 2011). La crioconservazione del germoplasma di soggetti prepuberi mostra, al contrario, un maggior numero di applicazioni in campo animale.

L'impiego di ovociti provenienti da animali prepuberi rappresenta un'opzione attraente nell'ambito del miglioramento genetico di animali d'interesse zootecnico. Utilizzando animali molto giovani come fonte di gameti, infatti, si possono ridurre notevolmente i tempi di riproduzione che intercorrono tra una generazione e l'altra. Inoltre, le ovaie di animali che non hanno ancora raggiunto la pubertà sono particolarmente ricche di ovociti, permettendo un recupero numerico decisamente superiore rispetto all'animale adulto. (Koeman et al., 2003; Ledda et al., 1997).

Tuttavia, le caratteristiche degli ovociti di animali prepuberi presentano delle differenze notevoli rispetto a quelli di animali che hanno raggiunto la piena maturità riproduttiva, le quali si traducono, poi, in una generale riduzione della competenza allo sviluppo. La differenza morfologica più evidente riguarda la dimensione. Infatti, gli ovociti di agnella hanno un diametro medio esterno di 141 μm , rispetto ai 158 dell'adulto. Da un punto di vista funzionale, è stato visto che gli ovociti di agnella maturano e vengono fecondati in vitro con

la stessa efficienza di quelli di pecora. Tuttavia, in seguito ad IVF, essi mostrano un aumento delle percentuali di fertilizzazione anomala, ritardo nella cinetica di sviluppo embrionale e ridotta capacità di sviluppare fino allo stadio di blastocisti. (Ledda et al., 1997, O'Brien et al., 1996; O'Brien et al., 1997b, Kochhar et al., 2002, Leoni et al., 2006). Tuttavia, le blastocisti prodotte in vitro, sono morfologicamente indistinguibili da quelle ottenute da ovociti di adulto, sia in termini di numero cellulare, sia per il rapporto tra la massa cellulare interna e il numero di cellule totali (Kochhar et al., 2002; Leoni et al., 2006), anche se, poi, una volta trasferite in utero, esse non mostrano lo stesso tasso di impianto, sopravvivenza e parto a termine. (Ptak et al., 1999; Kelly et al., 2005; O'Brien 1997a). La diversa competenza allo sviluppo dell'ovocita prepubere risiede nelle diverse caratteristiche metaboliche e citoplasmatiche che lo differenziano. Sebbene non siano state trovate differenze nella morfologia degli organelli citoplasmatici, quali mitocondri, complesso del Golgi, gocce lipidiche e del reticolo endoplasmatico (Ledda et al., 2007, 2001), è stato visto che, in seguito alla maturazione, si ha un ritardo nella migrazione dei granuli corticali (O'Brien et al., 1996). Nell'ovocita prepubere si ha una generale riduzione di diversi processi, tra cui sintesi proteica, assimilazione di aminoacidi e metabolismo della glutamina (Ledda et al., 1999, 2001; Kochhar et al., 2002; O'Brien et al., 1996). E' stata, inoltre, descritta la presenza di un accoppiamento difettivo tra ovocita e cellule del cumulo, necessarie per la corretta maturazione (Ledda et al., 1999, 2001). L'analisi dell'MPF (Maturation Promoting Factor) ha mostrato che le normali fluttuazioni del complesso avvengono in maniera simile tra pecora adulta e prepubere durante la progressione meiotica. Tuttavia, nell'ovocita prepubere giunto allo stadio di MII, i livelli di MPF sono inferiori, contribuendo a rendere il gamete più instabile e maggiormente suscettibile all'attivazione partenogenetica spontanea (Ledda et al., 2001). Altri studi sulla composizione molecolare hanno, inoltre, rivelato la presenza di minor contenuto mRNA e riduzione della metilazione globale del genoma (Leoni et al., 2007; Ptak

et al., 2006). La vitrificazione di ovociti di pecora prepubere è stata scarsamente studiata. In bibliografia, sono presenti, infatti, pochi lavori, unicamente due lavori relativi alla vitrificazione dell'ovocita maturato in vitro (Succu et al., 2007b; Berlinguer et al., 2007), in cui la vitrificazione non ha ottenuto grandi successi (Silvestre et al., 2006; Succu et al., 2007b; Berlinguer et al., 2007).

2 - OBIETTIVI DELLA SPERIMENTAZIONE

L'approccio sperimentale proposto nel presente lavoro è stato disegnato allo scopo di sviluppare nuovi sistemi di vitrificazione per migliorare la sopravvivenza e la competenza allo sviluppo del gamete femminile e, al contempo, testare la potenzialità applicativa di nuove strategie per l'analisi non invasiva dello stato funzionale dell'ovocita vitrificato.

Lo studio è stato condotto sul modello ovino, utilizzando ovociti immaturi (stadio di vescicola germinale (esperimento 1) e maturati in vitro (stadio di metafase II, esperimento 2) derivanti da animali adulti e prepuberi. La ricerca ha previsto l'impiego di due differenti sistemi di vitrificazione (V1 e V2), che differiscono per la concentrazione dei crioprotettori e tempi di esposizione dell'ovocita durante le fasi di equilibratura e vitrificazione. In particolare, al fine di minimizzare la tossicità dei crioprotettori e lo stress osmotico, il protocollo V1 è stato disegnato secondo un sistema multi-steps che permette un'esposizione graduale e dinamica del gamete femminile a gradienti di concentrazioni crescenti di crioprotettori. Tale protocollo è stato messo a confronto con un sistema di vitrificazione two-steps, contraddistinto da più elevate concentrazioni di crioprotettori e tempi di esposizione più brevi, secondo la metodologia di Kuwayama et al., (2005).

La sperimentazione è stata indirizzata alla valutazione dell'effetto dei due sistemi di vitrificazione sulle componenti strutturali e molecolari dell'ovocita. In dettaglio sono state analizzate:

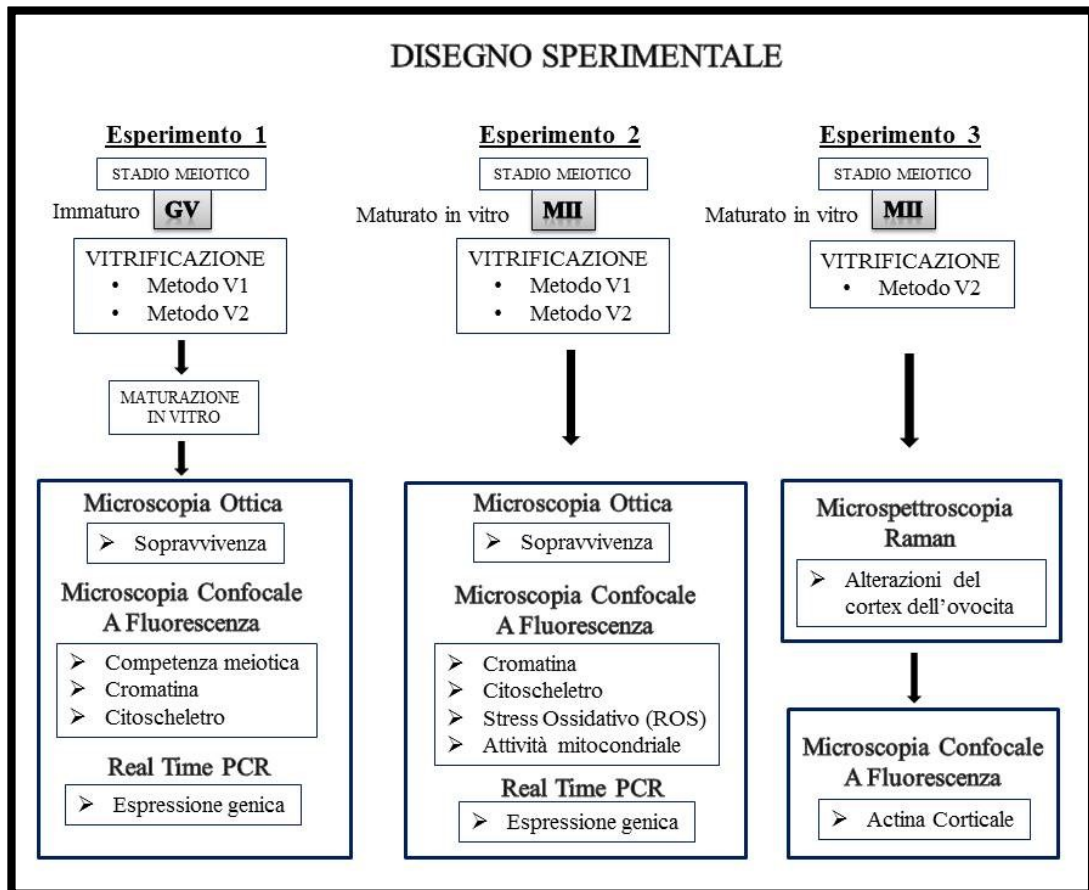
- alterazioni della cromatina e delle componenti citoscheletriche dell'ovocita (microtubuli del fuso meiotico e microfilamenti della regione corticale);
- variazione dei pattern di espressione genica dell'ovocita. Per tale scopo è stato preso in analisi un pannello di geni coinvolti in differenti funzioni cellulari, quali ciclo cellulare

(ciclina B, P34), organizzazione del citoscheletro (Actb, Hook1, Kif11), risposta allo stress (Cirpb, Hsp90b, Sod1) e apoptosi (Bax);

- modificazioni dello stato ossido-riduttivo dell'ovocita, che possono portare ad insorgenza di condizioni di stress ossidativo, mediante analisi dell'attività mitocondriale e dei livelli delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Inoltre, dal punto di vista metodologico, la sperimentazione ha incluso (esperimento 3), accanto all'impiego di tecniche d'indagine standardizzate (microscopia confocale a fluorescenza, PCR) l'applicazione di nuove metodologie, quali la microspettroscopia Raman (RMN). In dettaglio, è stata testata la potenzialità applicativa di tale tecnica per la valutazione delle modificazioni indotte dalla vitrificazione nella regione corticale dell'ovocita, con particolare riferimento ai microfilamenti del citoscheletro.

DISEGNO SPERIMENTALE



3 - MATERIALI E METODI

REAGENTI

Tutti i reagenti, tranne dove diversamente specificato, sono stati acquistati presso la ditta Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

3.1 COLLEZIONE DEGLI OVOCITI

Le ovaie di pecora adulta e prepubere (Pecora Sarda, rispettivamente di 4-6 anni e 30-40 giorni di età) sono state recuperate presso mattatoi locali e trasportate in laboratorio entro due ore dalla raccolta, in PBS preriscaldato a 37°C. Ciascuna ovaia è stata posizionata in una piastra Petri in vetro, contenente Medium di Dissezione a 37°C, costituito da:

- TCM-199;
- Hepes 25mM;
- 50 UI/mL di streptomina e penicillina;
- 0,1% (w/v) di alcol di polivinile (PVA);
- NaCO₃ 0,005 M.

Le ovaie sono state sezionate lungo l'asse longitudinale con una lama di bisturi e processate attraverso slicing, per favorire il rilascio dei complessi cumulo-ovocita (COC) nel medium. I COC sono stati esaminati allo stereomicroscopio e selezionati secondo i seguenti criteri morfologici. I COC che presentavano numerosi strati di cellule del cumulo, goccioline lipidiche uniformemente distribuite nel citoplasma, forma sferica, membrana plasmatica integra e zona pellucida intatta sono stati selezionati per la maturazione in vitro.

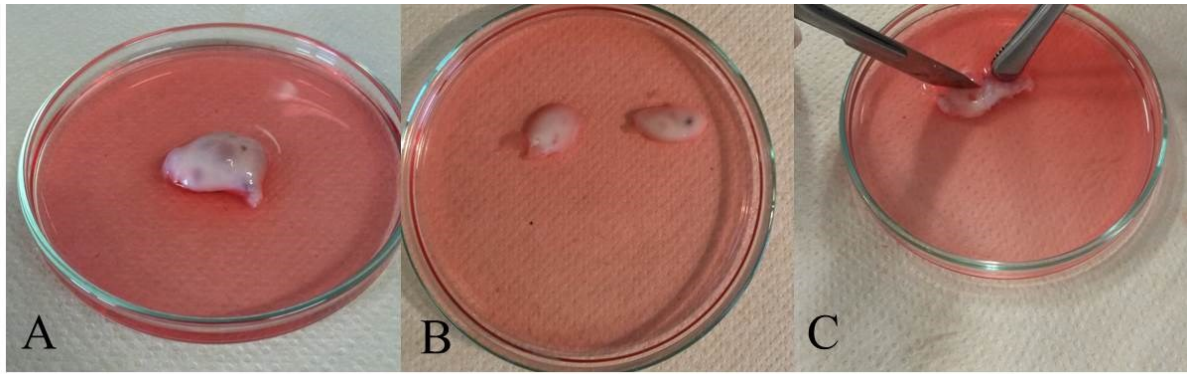


Fig 3.1: A) Ovaio intero di pecora adulta; B) Ovaio sezionato lungo l'asse longitudinale; C) procedura di slicing, eseguita per favorire il rilascio dei complessi cumulo-ovocita (COC) nel medium.

3.2 MATURAZIONE IN VITRO (IVM)

I complessi cumulo-ovociti sono stati maturati in incubatore per 24h a 38°C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in Medium di Maturazione composto dai seguenti componenti:

- TCM 199 supplementato con 50 UI/mL di streptomicina e penicillina, 0,1% (w/v) di alcol di polivinile (PVA),
- NaHCO₃ 0,02 M;
- 10% di siero di pecora in estro inattivato con il calore (OSS);
- 0,1 IU/mL di FSH (ormone follicolo stimolante) e 0,1 IU/mL di LH (ormone luteinizzante);
- cisteamina 100 µM.

Il Medium di Maturazione è stato equilibrato in incubatore per 24h prima del suo utilizzo. Gruppi di 50 ovociti sono stati maturati in 450 µL di medium di maturazione coperto da 300 µL di olio minerale, in piastre 4-well.

Dopo la maturazione, gli ovociti sono stati incubati con ialuronidasi e liberati dalle cellule del cumulo, tramite un delicato pipettamento effettuato con un capillare di vetro sterile. Gli ovociti maturi sono stati selezionati per gli esperimenti secondo criteri morfologici, che includono presenza di globulo polare, lipidi citoplasmatici uniformemente distribuiti, forma sferica regolare, spazio perivitellino regolare, membrana citoplasmatica intatta e zona

pellucida integra. Tutte le operazioni di manipolazione sono state effettuate su piastra riscaldata a 37°C.

3.3 VITRIFICAZIONE E RIPRISTINO DELLA TEMPERATURA

Vitrificazione

La vitrificazione è stata condotta utilizzando i due protocolli di vitrificazione V1 e V2.

La vitrificazione con il protocollo V1 ha previsto un approccio multi-step, equilibrando gli ovociti in maniera dinamica tramite l'utilizzo di gradienti crescenti di crioprotettori. Il sistema V2 ha, invece, impiegato un'esposizione ai crioprotettori di tipo two-step.

1) SISTEMA DI VITRIFICAZIONE 1 (V1):

Composizione delle soluzioni utilizzate:

- ✓ Soluzione 1 (S1): Holding Medium (HM, costituito da Medium di Dissezione + 20% di FCS) contenente il 7,5% (v/v) di etilen glicole (EG) e il 7,5% (v/v) di dimetilsolfossido (DMSO);
- ✓ Soluzione 2 (S2): HM + 15% di EG (v/v) e 15% di DMSO (v/v) + saccarosio 0,5 M.

Procedimento:

Per ottenere una graduale equilibratura tra ovociti e crioprotettori, una goccia di HM da 100 µL è stata posizionata su una piastra Petri e affiancata a due gocce dello stesso volume di soluzione 1 (S1). In seguito, sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- ✓ Posizionamento di 5-7 ovociti nella goccia di HM e incubazione per un minuto;
- ✓ Fusione della prima goccia di S1 con la goccia di HM contenente gli ovociti. In questo modo, gli ovociti sono stati esposti alle concentrazioni di 3,75% di EG e 3,75% DMSO per un minuto;
- ✓ Fusione della seconda goccia di S1 con le due gocce fuse in precedenza, per

raggiungere la concentrazione finale del 6,25% di EG e 6,25% di DMSO per un minuto;

- ✓ Trasferimento degli ovociti in una goccia pura di S1 alla concentrazione finale di 7,5% EG e 7,5% DMSO e incubazione per 5-7 minuti, a seconda del grado di riespansione dell'ovocita.
- ✓ Incubazione per 20 secondi in una goccia da 100 μ L di S2 (15% EG e 15% di DMSO);
- ✓ Caricamento degli ovociti sul Cryotop (Kuwayama e Kato, 2000) seguendo il metodo MEV (Minimum Essential Volume);
- ✓ Immersione del Cryotop in azoto liquido.

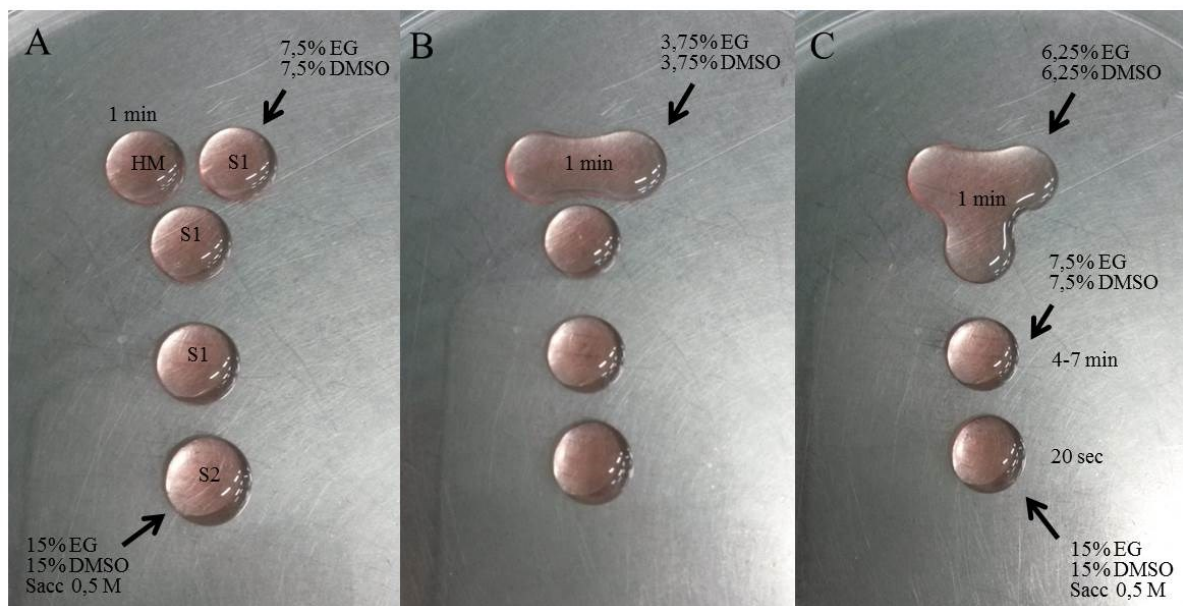


Fig 3.2: Sistema di vitrificazione VI. A) Sistema all'inizio dell'equilibratura: gli ovociti vengono inizialmente posti nella goccia di HM per un minuto; B) Fusione della prima goccia di S1 con la goccia di HM; C) Fusione delle tre gocce iniziali, seguita dal trasferimento degli ovociti nella goccia S1 pura e dall'esposizione alla goccia finale di S2.

2) SISTEMA DI VITRIFICAZIONE 2 (V2):

Composizione delle soluzioni utilizzate:

- ✓ Soluzione 1 (S1): HM + 10% di EG (v/v) + 10% di DMSO (v/v);
- ✓ Soluzione 2 (S2): HM + 20% di EG (v/v) e 20% di DMSO (v/v) + saccarosio 0,25M.

Procedimento:

- ✓ Incubazione di 5-7 ovociti in una goccia da 100 μ L di S1 per 30 secondi;
- ✓ Incubazione degli ovociti in una goccia da 100 μ L di S2 per 20 secondi;
- ✓ Caricamento degli ovociti sul Cryotop con metodo MEV;
- ✓ Immersione del Cryotop nell'azoto liquido.

I due protocolli di vitrificazione V1 e V2 sono stati applicati per la crioconservazione degli ovociti prima (Esperimenti 1) e dopo (Esperimento 2) la maturazione in vitro. In seguito al ripristino della temperatura, gli ovociti vitrificati allo stadio di MII sono stati incubati per 1h in Medium di Maturazione, a 38°C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

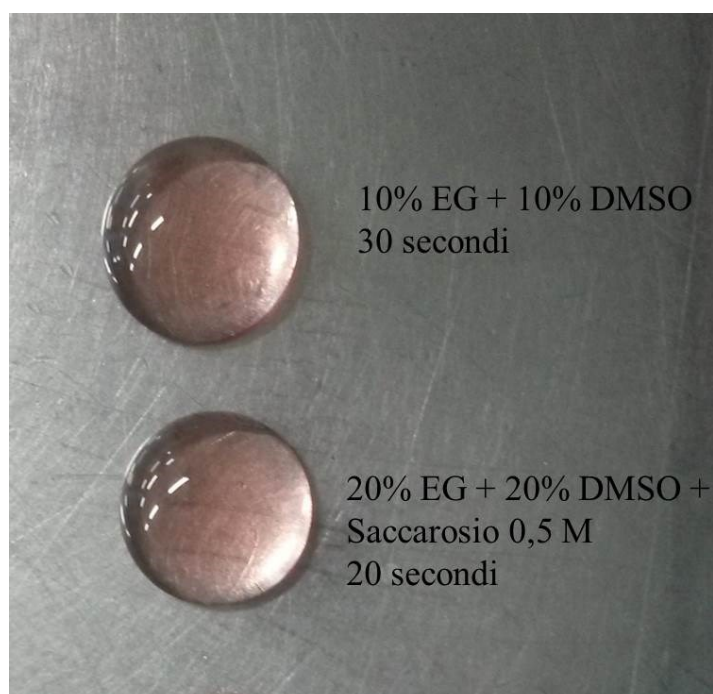


Fig. 3.3: Allestimento delle gocce di crioprotettori per la vitrificazione eseguita con il metodo V2.

Ripristino della temperatura

Lo scongelamento è stato effettuato a 38°C, immergendo il cryotop in HM addizionato con saccarosio 1,25 M per un minuto; successivamente gli ovociti sono stati lavati per 30 secondi in HM contenente concentrazioni decrescenti di saccarosio (0,86M, 0,63M, 0,38M, 0,13M, 0M). Dopo lo scongelamento, gli ovociti MII vitali sono stati incubati per 1h in Medium di Maturazione a 38°C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ e processati per le analisi successive. Nel caso della vitrificazione del COC, gli ovociti scongelati sono stati maturati in vitro per 24h. Dopo IVM, gli ovociti sono stati denudati dalle cellule del cumulo e sottoposti alla valutazione della vitalità, utilizzando i criteri descritti di seguito.

Tutte le operazioni di vitrificazione/scongelamento sono state eseguite su piastra riscaldata a 37°C e gli ovociti sono stati manipolati utilizzando capillari di vetro sterili.

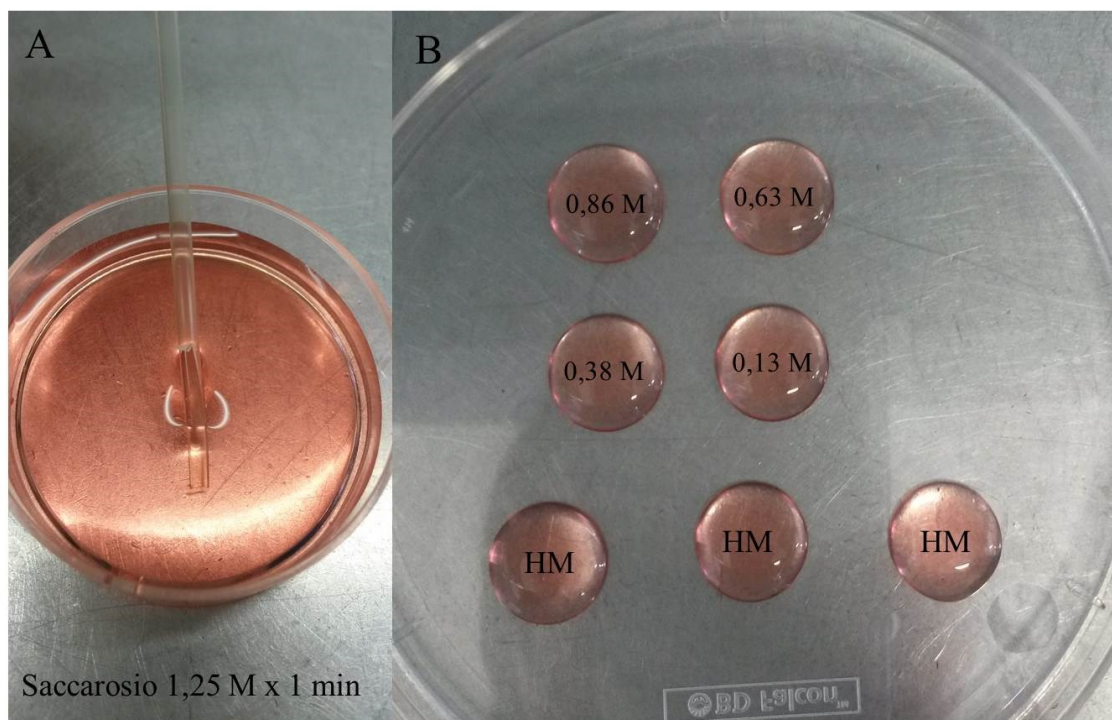


Fig 3.4: Procedura di scongelamento degli ovociti. Il cryotop, sul quale sono posizionati, i gameti viene immerso direttamente in saccarosio 1,25 M per un minuto (A); successivamente gli ovociti vengono lavati per 30 secondi in gocce di 200 μ L di HM contenente saccarosio a concentrazioni decrescenti (B).

Valutazione morfologica della sopravvivenza

In seguito al ripristino della temperatura, gli ovociti sono stati esaminati morfologicamente per la valutazione della sopravvivenza. Gli ovociti che presentavano le seguenti caratteristiche, sono stati considerati vitali:

- 1) Integrità di membrana
- 2) Zona pellucida intatta
- 3) Gocce lipidiche uniformemente distribuite e assenza di vacuoli
- 4) Forma regolare dell'oolemma e regolarità dello spazio peri-vitellino.

Negli ovociti vitrificati allo stadio di vescicola germinale, la valutazione della sopravvivenza è stata condotta in seguito alla maturazione in vitro.

3.4 VALUTAZIONE DELLA CONFIGURAZIONE DELLA CROMATINA E ANALISI DELLE COMPONENTI CITOSCHELETRICHE

Fissazione dei campioni

La fissazione dei campioni è stata effettuata utilizzando un buffer costituito dalle seguenti componenti:

- 50% di ossido di deuterio;
- 2% di formaldeide;
- 0,1% di Triton X-100;
- PIPES 100 mM;
- MgCl₂ 5 mM;
- EGTA 2,5 mM;
- Tassolo 1 mM;
- 10 U/mL di aprotinina.

I campioni sono stati immersi nel fissativo preriscaldato a 38°C e lasciati in agitazione per 45 minuti. Gli ovociti sono stati poi stoccati nella Soluzione di Lavaggio (SL) e conservati per la successiva colorazione immunofluorescente. La SL è composta da PBS addizionato con le seguenti componenti:

- 0,2% (w/v) di sodio azide;
- 2% (w/v) di siero di capra inattivato con il calore;
- 1% (w/v) di BSA (Bovine Serum Albumin);
- 0,1% (w/v) di glicina;
- 0,1% (v/v) di Triton-X 100.

Colorazione dei campioni per l'immunofluorescenza

Dopo la fissazione, gli ovociti sono stati processati per la colorazione simultanea di microtubuli, microfilamenti e DNA. Gli ovociti sono stati incubati overnight a 4°C nella Soluzione di Lavaggio contenente gli anticorpi primari mouse anti- α -tubulina (1:1000) e mouse anti- β -tubulina (1:100). Dopo un lavaggio di 30 minuti in 4 mL di SL a 37°C in

agitazione, gli ovociti sono stati incubati per un'ora a 37°C con l'anticorpo secondario donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Invitrogen) diluito 1:100, combinato con la falloidina rodaminata (1:150, Life Technologies, Invitrogen) in SL. Gli ovociti sono stati lavati per 30 minuti in 4 mL di SL e montati su vetrino utilizzando un mounting medium costituito da 50% PBS, 50% glicerolo, sodio azide 25mg/mL e 6 uL/mL di Hoechst 33258 (Bromfield et al., 2009). I vetrini sono stati sigillati con smalto per unghie trasparente e conservati al buio fino alla successiva analisi tramite Microscopia Confocale a Fluorescenza.

Analisi di cromatina e delle componenti citoscheletriche tramite microscopia confocale a fluorescenza

Gli ovociti sono stati analizzati tramite un Microscopio Confocale a Scansione Laser (Leica TCS SP5) equipaggiato con laser a 543 nm HeNe, 488 nm Argon e 405 nm 405-diodo. Le immagini sono state acquisite utilizzando un obiettivo 40x (NA=1,25) ad immersione in olio. Negli ovociti vitrificati allo stadio immaturo, e sottoposti a maturazione in vitro, l'analisi della progressione meiotica è stata condotta valutando la configurazione della cromatina e classificando gli ovociti nei seguenti stadi meiotici: vescicola germinale (GV), rottura della vescicola germinale (GVBD), metafase I (MI), anafase I (AI), telofase I (TI), metafase II (MII), attivata. Gli ovociti allo stadio di MII sono stati considerati maturi.

L'organizzazione dei cromosomi negli ovociti allo stadio di MII è stata classificata in:

- 1) Normale: i cromosomi apparivano regolarmente allineati lungo la piastra metafasica;
- 2) Anormale: i cromosomi apparivano dispersi, decondensati o assenti;
- 3) Attivata: la cromatina appariva organizzata in un singolo pronucleo.

La morfologia del fuso meiotico degli ovociti in MII è stata classificata in:

- 1) Normale: il fuso meiotico aveva una forma regolare ed appariva ben organizzato con i cromosomi;
- 2) Anormale: i microtubuli apparivano assemblati in maniera irregolare dando origine a fusi

aberranti;

3) Assente: i microtubuli non sono stati visualizzati.

L'actina corticale è stata esaminata negli ovociti MII a livello del piano equatoriale della cellula ed è stata classificata in:

1) Normale: i microfilamenti di actina formavano un anello intenso e regolare al di sotto della membrana plasmatica;

2) Anormale:

- ✓ Diffusa: i microfilamenti di actina apparivano diffusi e distribuiti in maniera irregolare;
- ✓ Discontinua: lo strato di actina corticale appariva interrotto sotto la membrana plasmatica;
- ✓ Assente: nessuno strato di actina è stato visualizzato sul piano equatoriale dell'ovocita.

3.5 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

Collezione degli ovociti per l'analisi dell'espressione genica

I campioni di RNA sono stati isolati da pool di ovociti sottoposti a vitrificazione, allo stadio di MII oppure vitrificati allo stadio GV e maturati in vitro per 24h. Nel secondo caso, solo gli ovociti aventi un globulo polare sono stati selezionati per l'analisi dell'espressione genica. Prima di essere stoccati, tutti gli ovociti sono stati denudati tramite incubazione con ialuronidasi e spipettati gentilmente attraverso un sottile capillare di vetro.

I campioni sono stati analizzati in pool contenenti 10 ovociti. Per ciascuna classe di ovociti sono stati analizzati da 3 a 6 pool.

In ogni pool sono stati aggiunti 20 μ L di buffer RLT del Kit RNeasy Micro (Qiagen, Hilden, Germania) per lisare gli ovociti e preservare l'integrità dell'RNA. I campioni sono stati successivamente congelati a -80°C fino all'isolamento dell'RNA.

Isolamento dell'RNA e trascrizione inversa

L'RNA totale è stato isolato dai gruppi di ovociti utilizzando il Kit RNeasy Micro (Qiagen, Hilden, Germania), seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice. 5 pg di mRNA di luciferasi (Promega) sono stati aggiunti ad ogni pool prima dell'estrazione dell'RNA. Questo passaggio è necessario per avere un controllo esterno, che consenta di monitorare eventuali perdite di RNA durante il processo di isolamento. Durante la procedura, l'RNA è stato trattato con DNAasi I, per evitare qualsiasi contaminazione da parte di DNA genomico. L'RNA isolato è stato eluito in 15 μ L di acqua RNAasi free e 13,5 μ L sono stati immediatamente utilizzati per la retrotrascrizione dell'RNA, tramite RT-PCR.

La retrotrascrizione è stata effettuata in un volume finale di 20 μ L, costituiti da Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl_2 3 mM, DTT 5 mM, dNTPs 1 mM, 2,5 μ M di primer esamerici a composizione casuale, , 0,05 μ g di oligo (dT)₁₈ primer, 20 U RNase OUT e U

SuperScript III RT (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

I tubi di reazione sono stati incubati a 25°C per 10 min, seguiti dall'incubazione a 42°C per 1h e dall'incubazione finale a 70°C per 15 min, per inattivare la reazione. Un tubo senza RNA ed un tubo con RNA, ma senza trascrittasi inversa, sono stati utilizzati come controlli negativi. Al fine di quantificare il tasso di recupero dell'mRNA, 5 pg di mRNA di luciferasi (non sottoposta a isolamento di RNA) sono stati retrotrascritti.

Reazione a catena della polimerasi real time

I primers di tutti i geni studiati sono elencati nella tabella 3.1. La quantificazione relativa dei trascritti è stata effettuata attraverso RT-PCR real time, utilizzando il sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystem, Foster City, CA). La reazione di PCR è stata condotta in un volume di 15 µL, contenente 7,5 µL di 2x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA), ciascun primer alla concentrazione di 200 nM e l'equivalente del cDNA contenuto in 0,25 ovociti.

Il protocollo della PCR consiste in due step di incubazione (50°C per 5 minuti e 95°C per 2 minuti), seguito da 40 cicli di amplificazione [95°C per 15 secondi, temperatura di annealing specifica per ciascun gene (consultare la tabella 3.1) per 30 secondi e 72°C per 30 secondi] e da un programma di curva di melting (65-95°C, iniziando l'acquisizione della fluorescenza a 65°C ed effettuando misurazioni ad intervalli di 10 secondi, fino al raggiungimento dei 95°C di temperatura). Infine, è stato effettuato un passaggio di raffreddamento a 4°C. I dati della fluorescenza sono stati acquisiti durante gli step di estensione a 72°C.

Per minimizzare le variazioni dovute a manipolazione, tutti i campioni da comparare sono stati fatti correre sulla stessa piastra, utilizzando la master mix di PCR, contenente tutti i reagenti tranne il campione.

I prodotti della PCR sono stati analizzati, generando una curva di melting per controllare la specificità e l'identità del prodotto di amplificazione. Per ogni coppia di primer, l'efficienza

della reazione di PCR è stata valutata mediante la costruzione di una curva standard, con diluizioni seriali di una quantità nota di template, coprendo almeno 3 ordini di grandezza, così che l'intervallo lineare della curva di calibrazione potesse includere l'intervallo al di sotto e al di sopra della quantità di template presente nel campione. Solo i primer che hanno raggiunto un'efficienza di reazione tra il 90% e il 110% ($3,6 > \text{SLOPE} > 3,1$) e un coefficiente di determinazione $r^2 > 0,99$ sono stati utilizzati per le analisi.

Le lunghezze dei prodotti della RT-PCR sono stati poi confermati tramite l'elettroforesi su gel al 2% di agarosio, marcato con Sybr Safe (Invitrogen) e visualizzati tramite luce blu. I prodotti della PCR sono stati sequenziati (Model 3130 xl Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), dopo la purificazione con il Kit di purificazione MinElute PCR (Qiagen) e le identità delle sequenze sono state confermate con BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

I dati della RT-PCR real time sono presentati come ΔC_q , media \pm SEM. La quantificazione relativa dei trascritti è stata effettuata dopo la normalizzazione dell'espressione media di *YWHAZ*, *RPL19* e *G6PD*. Il quantitativo relativo di mRNA bersaglio normalizzato di ogni specifico campione è stato ottenuto sottraendo il livello di espressione del calibratore (ΔC_T campione = C_T campione - C_T calibratore), dove il calibratore è stato considerato il campione con la più alta quantità.

<i>Gene</i>	<i>Simbolo</i>	<i>Sequenza</i>	<i>T di annealing</i>	<i>Grandezza (bps)</i>
Cold inducible RNA binding protein	CIRBP	gagggctgagtttgacacc atgggaagtctgtggatggg	65°C	190
Superoxide dismutase 1	SOD1	ggcaatgtgaaggctgacaa aagaccagatgactgggca	58°C	130
Kinesin family member 11	KIF11	tgatcttcaggcagtgaga ccctctgactctgggaagg	62°C	100
Ovis aries hook homolog 1	HOOK1	gaatccgagagttgcagcag gaagacctccagccagatgt	64°C	186
Actina β	ACTB	ttcctgggatggatcctg ggtgatctccttctgcatcc	60°C	162
P34 ^{cdc2}	P34	ctgtggagaactcttagag gaatccatgaactgaccagga	60°C	96
Ciclina b	Ciclina-b	cagtgtatgacagtaatgc cgtagtccagcatagttagt	56°C	134
Bax	BAX	ctccccgagaggtcttttc tcgaaggaagtccaatgtcc	58°C	176
Heat shock protein 90b	HSP90B	tggagatcaacctgacca gggatcctcaagcgagaag	58°C	143

Tab 3.1: Informazioni sui primer utilizzati per l'amplificazione tramite PCR

3.6 ANALISI DEI LIVELLI DI ROS E DELL'ATTIVITA' MITOCONDRIALE

Gli ovociti vitrificati allo stadio di MII, di pecora e di agnella, sono stati processati per la valutazione dell'attività dei mitocondri e dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Dopo lo scongelamento e 1h di incubazione in medium per IVM, gli ovociti sono stati lavati 3 volte in PBS supplementato con il 3% di BSA (Bovine Serum Albumin) e incubati al buio per 30 minuti in PBS + 3% di BSA contenente 280nM di Mitotracker Orange (Molecular Probes M-7510, Oregon, USA), a 38°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Dopo l'incubazione, gli ovociti sono stati lavati 3 volte in PBS contenente lo 0,3% di BSA e incubati per 15 minuti nello stesso medium, supplementato con 2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato (H₂DCF-DA) alla concentrazione di 10 µM. Terminata l'incubazione, gli ovociti sono stati lavati tre volte in PBS e fissati overnight in PFA al 2% in PBS (Russo et al., 2014).

Gli ovociti così processati, sono stati montati su un vetrino, utilizzando il mounting medium (paragrafo 3.4) e sigillati con smalto per unghie trasparente. I vetrini sono stati conservati al buio fino all'analisi tramite microscopia confocale a fluorescenza.

L'analisi in microscopia confocale (Leica TCS SP5) è stata condotta utilizzando le lunghezze d'onda di 633 e 488 nm di eccitazione, per visualizzare rispettivamente le fluorescenze di Mitotracker Orange e H₂DCF-DA. Le immagini sono state acquisite sul piano equatoriale di ciascun ovocita, mantenendo costanti parametri relativi all'intensità di fluorescenza, come potenza del laser, smart gain e ampiezza del pinhole, durante tutte le misurazioni. In ciascun ovocita, l'intensità della fluorescenza è stata misurata utilizzando il software Leica LAS AF Lite, tracciando un ROI lungo il perimetro del citoplasma dell'ovocita. I valori di fluorescenza di background sono stati sottratti dai valori finali prima dell'analisi statistica.

3.7 ANALISI STATISTICA

Il test del χ^2 quadro è stato applicato all'analisi delle differenze significative nella sopravvivenza, progressione meiotica, configurazione di cromatina e citoscheletro. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $P < 0,05$.

I dati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica sono stati statisticamente analizzati utilizzando il software MINITAB versione 12,1 (Minitab Inc., State College, PA, USA). Dopo il test di normalità e dell'uguaglianza delle varianze, utilizzando rispettivamente i test di Kolmogorov–Smirnov e Levene, i dati dei trascritti sono stati analizzati tramite l'analisi della varianza (ANOVA), seguito eventualmente dal t-test di Student. Le differenze sono state considerate significative per $P < 0,05$.

L'analisi statistica dei valori di intensità di fluorescenza in seguito a marcatura con DHCFDA e Mitotracker Orange è stata effettuata attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal t-test di Student. Le differenze sono state considerate significative per $P < 0,05$.

4 - ESPERIMENTO 1

4.1 OBIETTIVO:

Lo scopo di questo esperimento è stato quello di analizzare gli effetti dei due diversi protocolli di vitrificazione V1 e V2 sull'ovocita immaturo (stadio di vescicola germinale, GV) di pecora adulta e prepubere. In particolare, dopo il ripristino della temperatura e maturazione in vitro sono state analizzate:

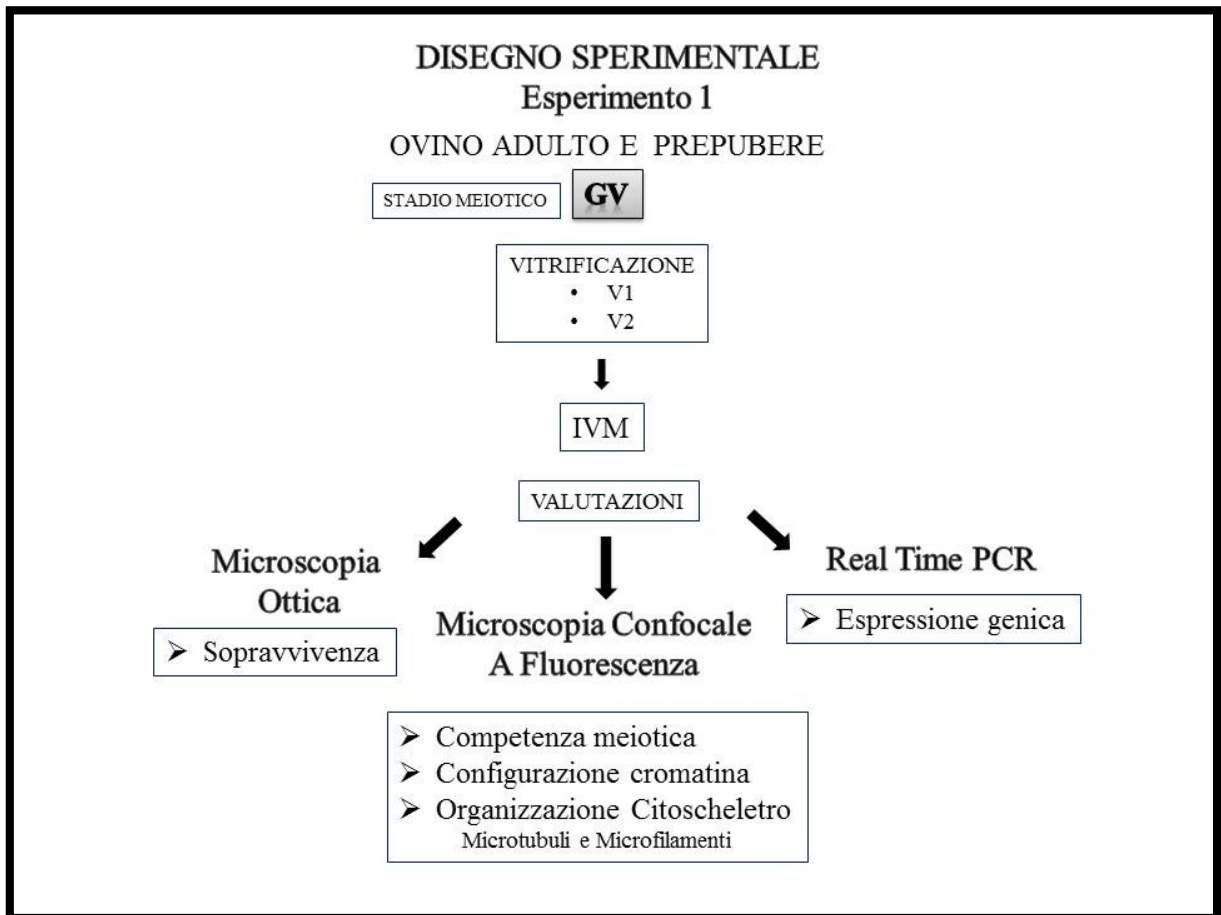
- 1) sopravvivenza dell'ovocita;
- 2) progressione meiotica;
- 3) alterazioni della cromatina e delle componenti citoscheletriche (microtubuli del fuso meiotico e microfilamenti della regione corticale);
- 4) variazione dei pattern di espressione genica dell'ovocita (ciclina b, P34, Actb, Hook1, Kif11, Cirbp, Hsp90b, Sod1, Bax);

4.2 DEFINIZIONE DEI GRUPPI SPERIMENTALI

Subito dopo il prelievo dalle ovaie, i complessi cumulo-ovocita (COCs) di pecora e adulta e prepubere sono stati vitrificati allo stadio di vescicola germinale (immaturi, GV) secondo i sistemi V1 e V2. Gli ovociti sono stati suddivisi nei seguenti gruppi sperimentali:

- CTR: non sottoposti a vitrificazione (n=101);
- Adulto:
- V1: COCs vitrificati secondo il sistema V1 (n=99);
 - V2: COCs vitrificati secondo il sistema V2 (n=95).
-
- CTR: non sottoposti a vitrificazione (n=89);
- Prepubere:
- V1: COCs vitrificati secondo il sistema V1 (n=101);
 - V2: COCs vitrificati con metodo V2 (n=106).

Gli ovociti dei differenti gruppi sperimentali sono stati maturati in vitro per la valutazione della competenza meiotica. Dopo maturazione, gli ovociti in metafase II sono stati processati per le analisi strutturali e molecolari, secondo il seguente disegno sperimentale in base alla metodologia riportare nelle sezioni dei Materiali e Metodi.



4.3 RISULTATI

1) Valutazione della sopravvivenza

Come si evince dalla figura 4.2, in seguito alla vitrificazione con metodi V1 (82,83%) e V2 (66,32%) e alla maturazione in vitro, le percentuali di sopravvivenza degli ovociti di pecora adulta sono risultate significativamente inferiori rispetto al gruppo CTR (98,02%, $P < 0,05$). Tuttavia, la vitrificazione con il sistema V1 ha permesso di ottenere percentuali di ovociti vitali significativamente maggiori rispetto al gruppo V2.

La vitrificazione degli ovociti di prepubere ha ridotto le percentuali di sopravvivenza nei gruppi V1 (69,31%) e V2 (50,94%) rispetto al gruppo CTR (95,4%, $P < 0,05$). Analogamente a quanto osservato negli ovociti di animale adulto, la sopravvivenza degli oociti è stata maggiore in seguito alla vitrificazione con metodo V1 rispetto al metodo V2 ($P < 0,05$).

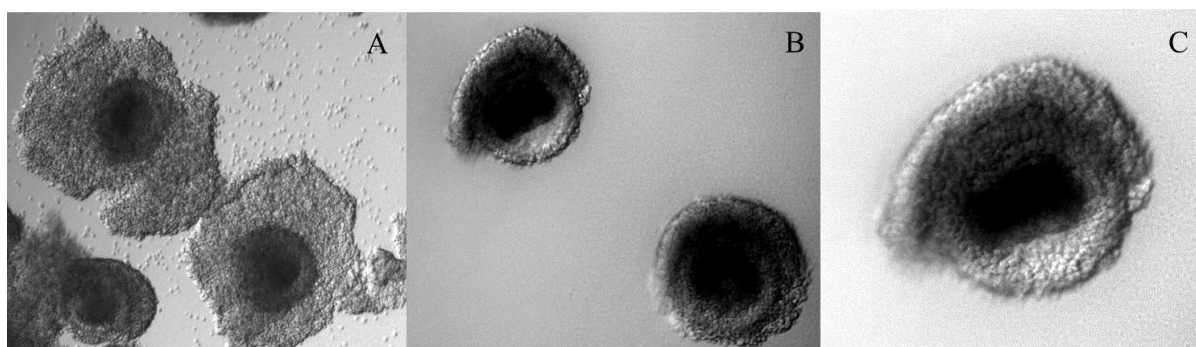


Fig. 4.1: A) Complessi cumulo ovocita di pecora adulta subito dopo il prelievo dalle ovaie; B-C) Fasi di esposizione dell'ovocita ai crioprotettori.

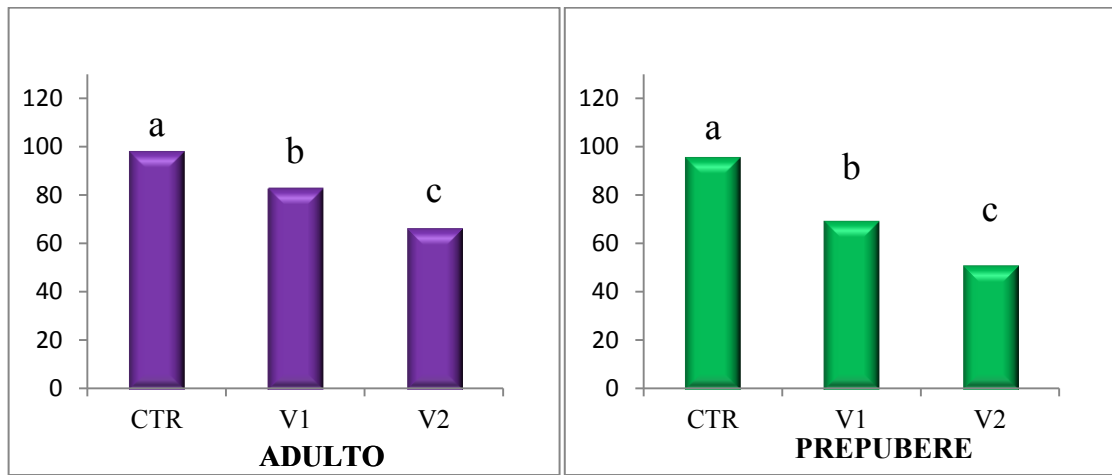


Fig. 4.2: Sopravvivenza degli ovociti immaturi di pecora adulta e prepubere dopo vitrificazione con due differenti sistemi (gruppi V1 e V2) e maturazione in vitro, (a vs b vs c, $P < 0,05$, test del χ^2).

2) Valutazione della competenza meiotica

Le percentuali di ovociti di adulto che hanno ripreso la meiosi e hanno raggiunto lo stadio di metafase seconda (MII) dopo vitrificazione con i sistemi V1 (60,98%) e V2 (55,56%) è risultata inferiore rispetto agli oociti del gruppo CTR (96,97%, $P < 0,05$). Inoltre, dopo vitrificazione con entrambi i sistemi (V1: 32%; V2: 11,11%) gli oociti hanno mostrato percentuali di attivazione partenogenetica spontanea maggiori rispetto al controllo (0%, $P < 0,05$) (Fig.4.3).

Dopo la vitrificazione e la maturazione in vitro degli ovociti di prepubere, l'analisi della progressione meiotica ha messo in evidenza che la vitrificazione con i sistemi V1 (44,29%) e V2 (35,19%) ha ridotto le percentuali di ovociti maturi nei gruppi rispetto al gruppo CTR (76,19%, $P < 0,05$). Le percentuali di attivazione spontanea in seguito a vitrificazione con metodi V1 (20%) e V2 (33,3%) si sono attestate su valori più elevati rispetto al controllo (4,76%, $P < 0,05$) (Fig 4.4).

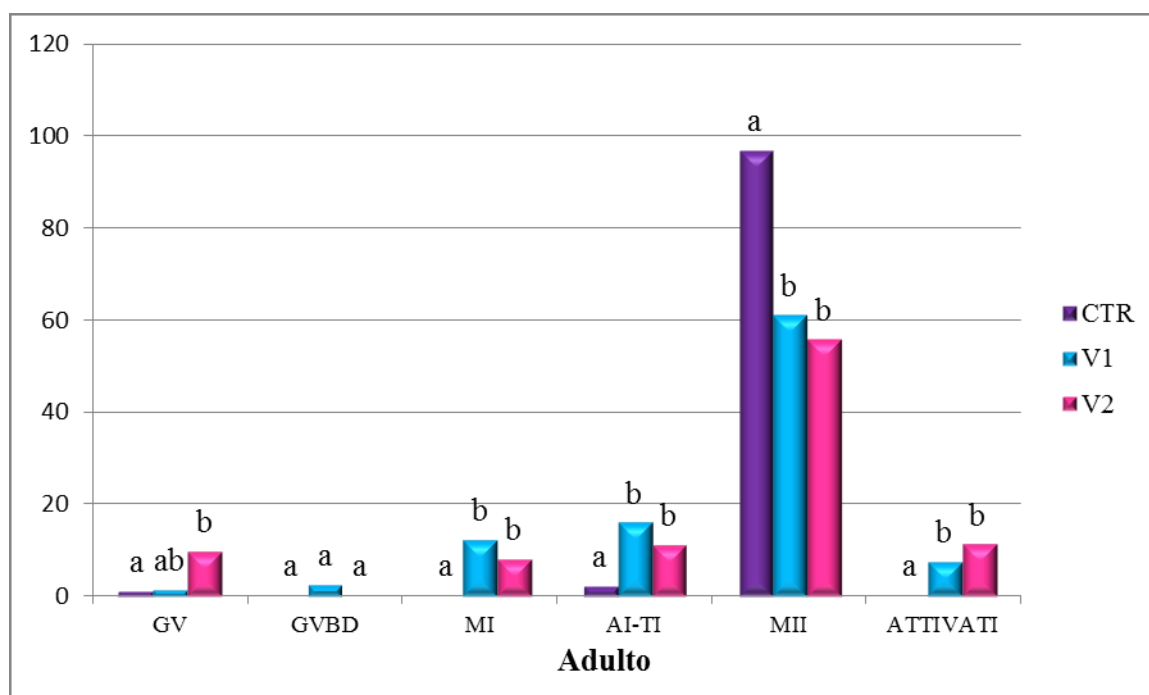


Fig. 4.3: Progressione meiotica degli ovociti di pecora adulta in seguito a vitrificazione con metodo V1 e V2 e maturazione in vitro. (a vs b vs c, $P < 0,05$, test del χ^2).

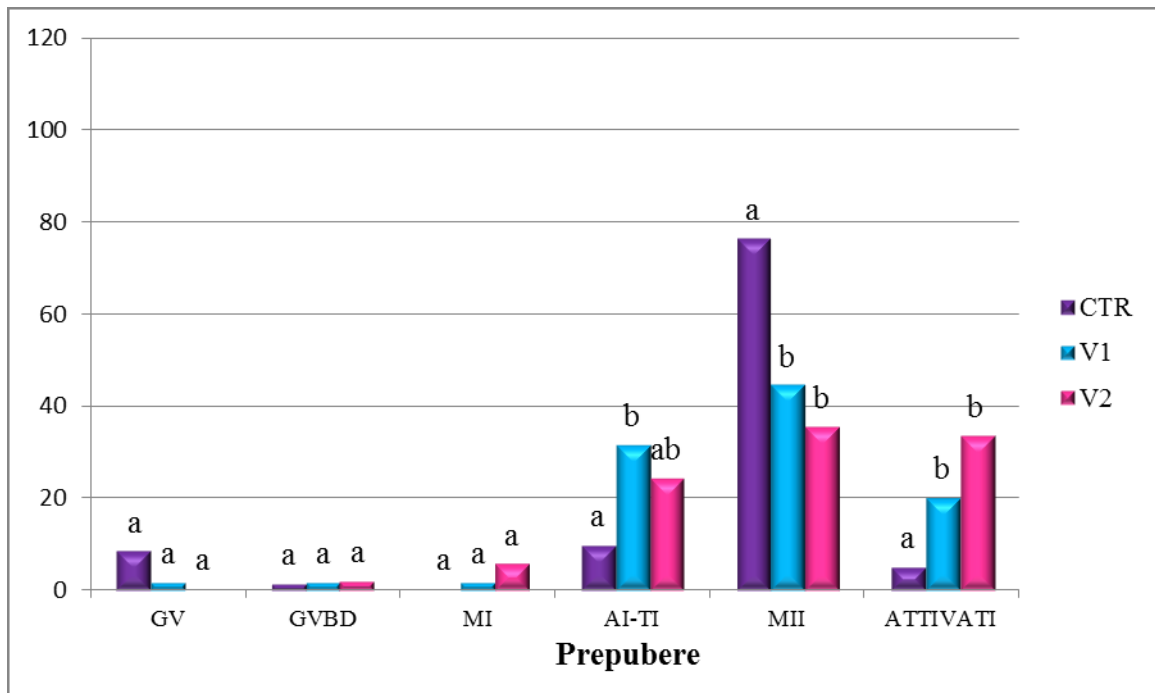


Fig. 4.4: Progressione meiotica degli ovociti di pecora prepubere dopo vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2).
(a vs b vs c, $P < 0,05$).

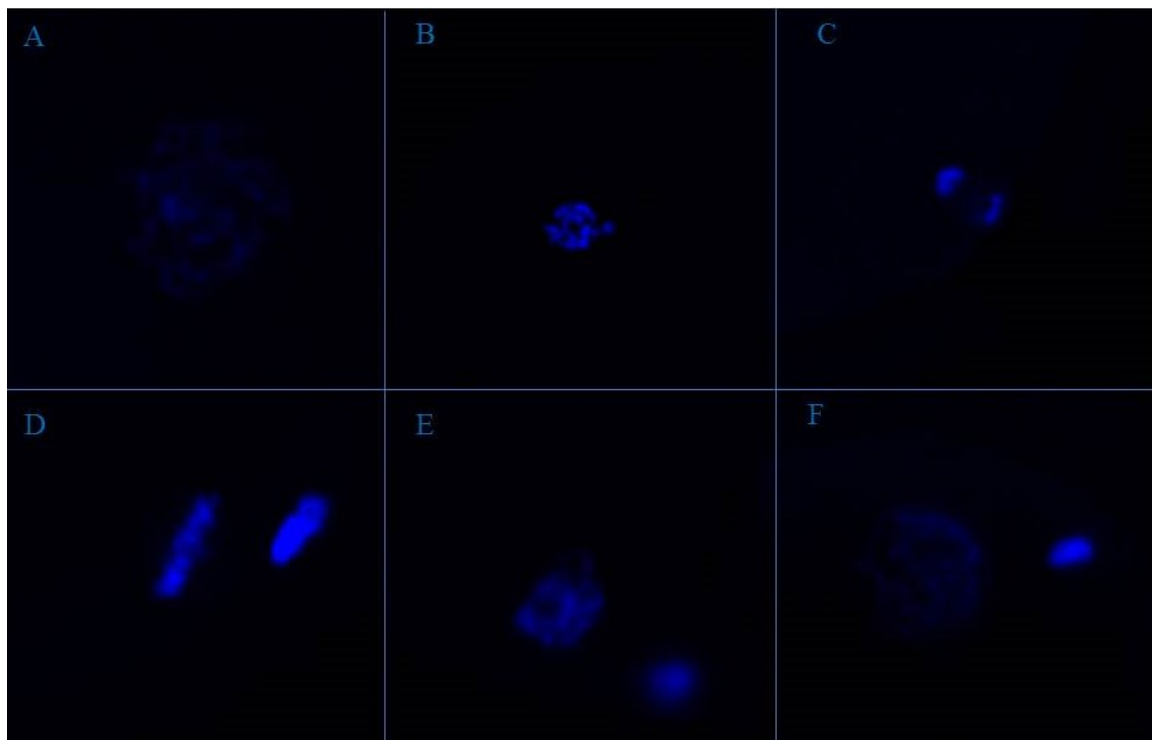


Fig. 4.5: Configurazione della cromatina nei differenti stadi della progressione meiotica; A) GV; B) GVBD; C) TI; D) MII; E-F) Forme di attivazione partenogenetica spontanea

3) Valutazione della configurazione della cromatina ed analisi delle componenti citoscheletriche

Gli ovociti allo stadio di Metafase II di pecora adulta dei differenti gruppi sperimentali (CTR n=96; V1 n=50; V2 n=35) e prepubere (CTR n=64; V1 n=31; V2 n=19) sono stati analizzati per valutare la configurazione della cromatina e delle componenti citoscheletriche.

3.1) Analisi della configurazione della cromatina

Nella pecora adulta, la vitrificazione con metodi V1 (88%) ha permesso di ottenere percentuali di ovociti con regolare configurazione della cromatina, comparabili al gruppo CTR (95,83%). Al contrario, la vitrificazione con il metodo V2 (60%) ha significativamente ridotto la percentuale di ovociti con normale organizzazione della cromatina rispetto al gruppo CTR.

Negli ovociti di prepubere, dopo vitrificazione con entrambi i sistemi V1 (38,71%) e V2 (52,63%) sono state registrate percentuali di ovociti con cromatina regolarmente organizzata nella piastra equatoriale inferiori rispetto al gruppo CTR (93,75%, $P < 0,05$).

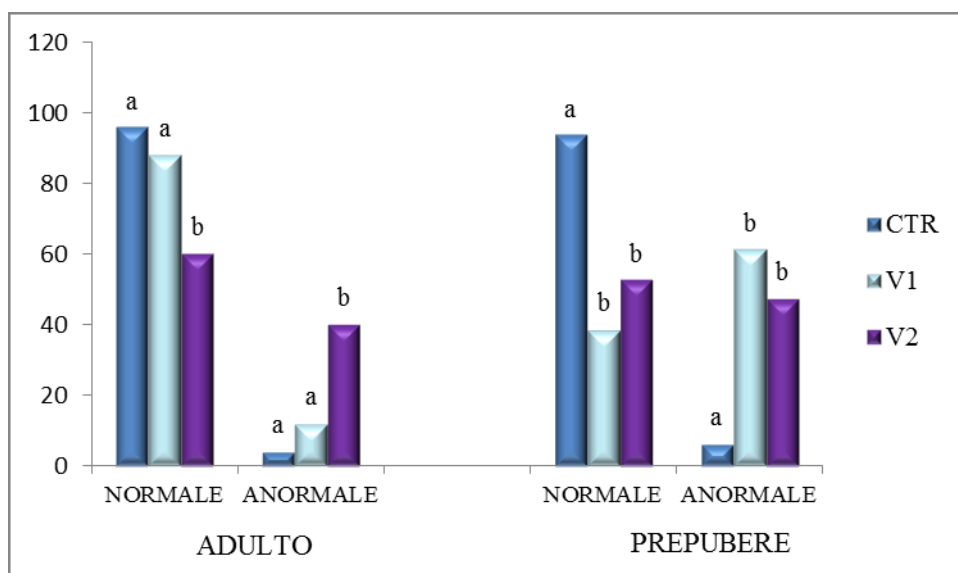


Fig 4.6: Configurazione della cromatina degli ovociti di pecora adulta e prepubere in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2) e maturazione in vitro. (a vs b vs c, $P < 0,05$, test del χ^2).

3.2) Morfologia del fuso meiotico

Come si evince dalla fig. 4.7, la vitrificazione dell'ovocita di pecora adulta con entrambi i metodi V1 (74%) e V2 (51,43%) ha diminuito in maniera significativa le percentuali di ovociti con regolare morfologia del fuso meiotico rispetto al CTR (92,71%, $P < 0,05$).

Allo stesso modo, le percentuali di ovociti di pecore prepuberi con fuso meiotico normalmente assemblato sono state significativamente inferiori nei gruppi V1 (32,26%) e V2 (57,89%) rispetto al gruppo CTR (89,06%, $P < 0,05$).

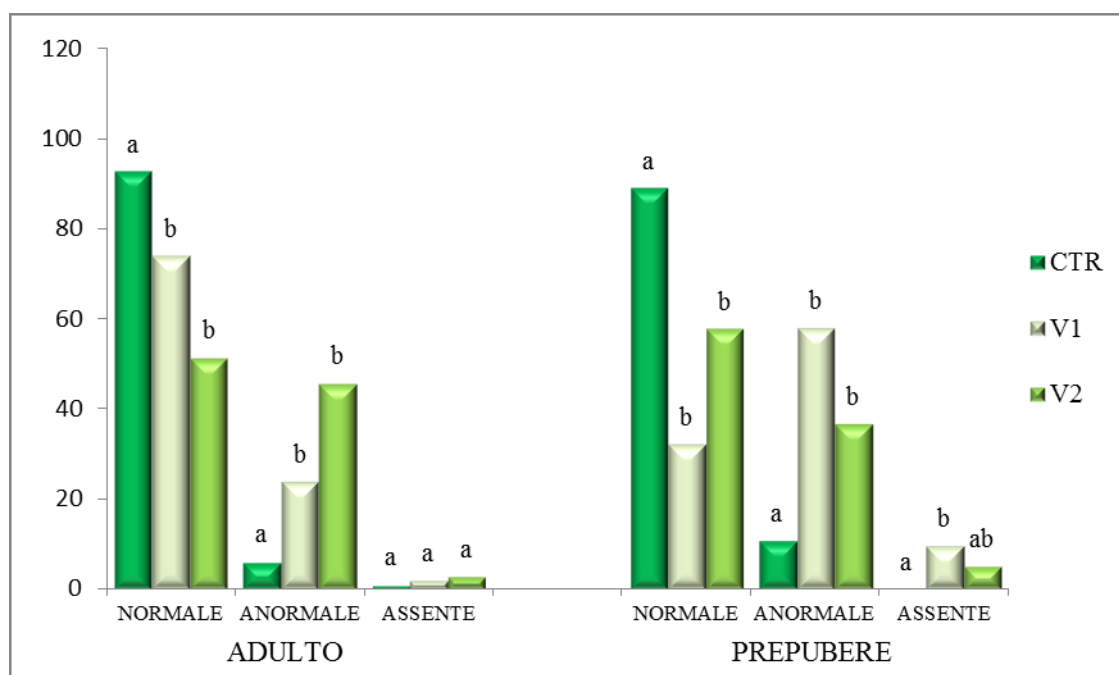


Fig 4.8: Configurazione del fuso meiotico degli ovociti di pecora adulta e prepubere in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2) e maturazione in vitro. (a vs b vs c, $P < 0,05$, test del χ^2)

3.3) Organizzazione dell'actina corticale

La morfologia dei microfilamenti di actina della regione corticale degli ovociti di adulto è stata compromessa dalla vitrificazione. Infatti, le percentuali di ovociti con microfilamenti di actina disposti a formare un ring intenso e regolare al di sotto della membrana plasmatica sono state inferiori nei gruppi V1 (70%) e V2 (37,14%) rispetto al gruppo CTR (87,5%, $P<0,05$). Tuttavia, l'utilizzo del sistema V1 si è rivelato superiore al metodo V2 ($P<0,05$).

Negli ovociti di prepubere la morfologia dei microfilamenti corticali è stato maggiormente danneggiata con l'utilizzo del sistema V1. Infatti, la percentuale di ovociti con regolare morfologia dell'actina è risultata minore nel gruppo V1 (35,48%) rispetto al CTR (79,69%, $P<0,05$), mentre percentuali comparabili sono state ottenute nei gruppi V2 (63,16%) e CTR

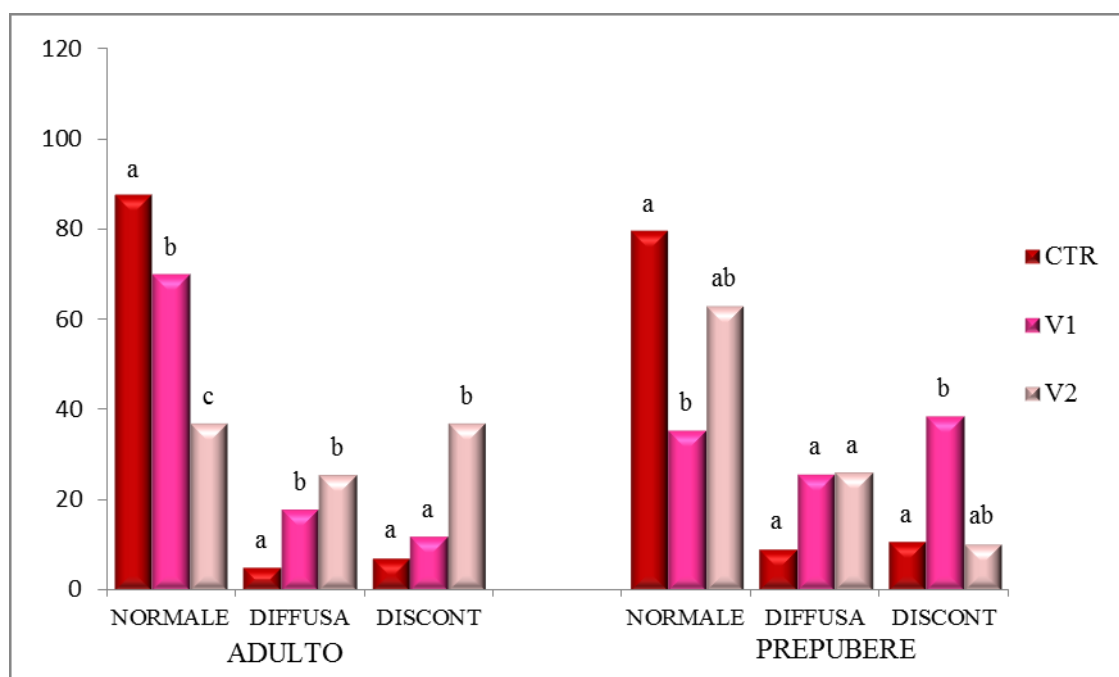


Fig 4.8: Configurazione dei microfilamenti nella cortex degli ovociti di pecora adulta e prepubere in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2) e maturazione in vitro.

(a vs b vs c, $P<0,05$, test del χ^2).

4) Analisi dell'espressione genica

Per tutti i geni analizzati è stata rilevata la presenza di RNA messaggeri, sia in ovociti di animali adulti che di prepuberi.

Nell'adulto, l'analisi dell'espressione genica nei gruppi CTR, V1 e V2 non ha evidenziato differenze significative relativamente all'espressione dei geni Bax, Cirbp, Ciclina B, Hook1, Hsp90b, P34 e Sod1. Invece, il contenuto di mRNA relativo del gene Act B è stato significativamente più alto nel gruppo V2, rispetto al gruppo CTR e al gruppo V1 ($P < 0,05$), mentre i livelli di espressione sono risultati comparabili tra i gruppi CTR e V1. L'espressione del gene Kif11 è stata significativamente maggiore nel sistema V2 rispetto al gruppo V1. Tuttavia, nessuna differenza è stata trovata tra i gruppi V1 e V2 rispetto al CTR (Fig 4.8).

L'analisi dell'espressione genica negli ovociti di prepubere, ha indicato che la vitrificazione con metodo V1 e V2 non ha alterato l'espressione de i tutti i geni analizzati (Fig 4.9).

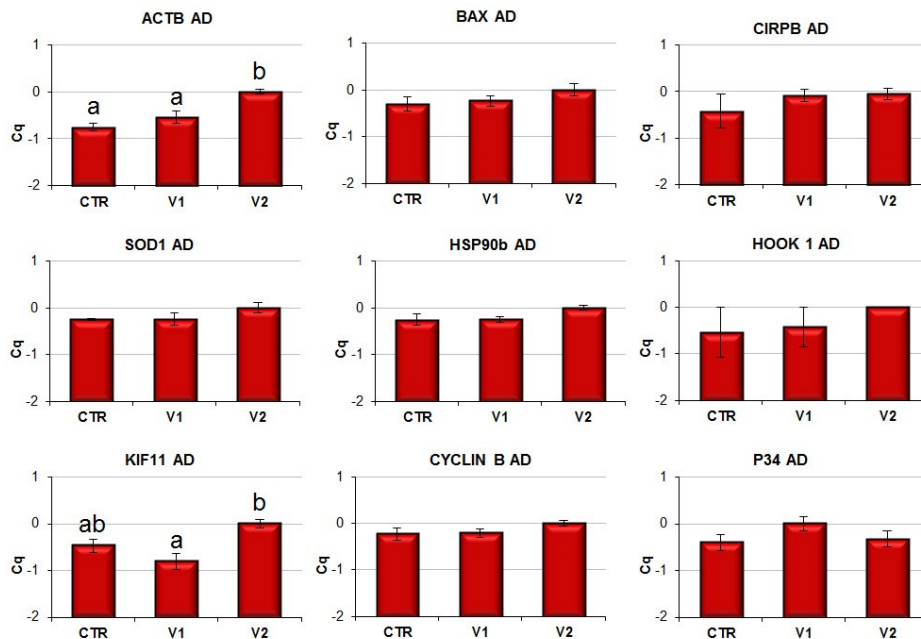


Fig 4.9: Rappresentazione grafica dell'abbondanza relativa dei trascritti dei geni analizzati negli ovociti di adulto in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2) e maturazione in vitro, espressa in unità densitometriche, come media \pm SEM. (a vs b vs c, $P < 0,05$, test del χ^2).

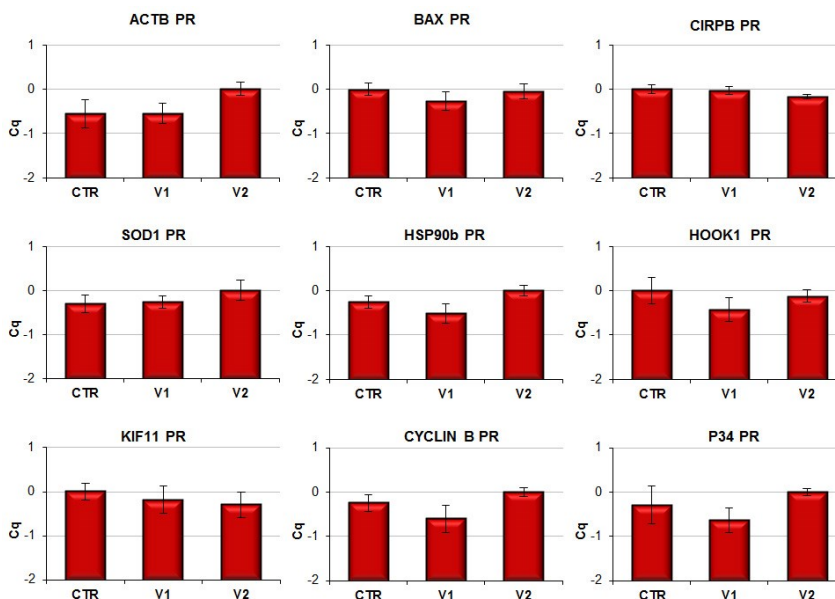


Fig 4.10: Rappresentazione grafica dell'abbondanza relativa dei trascritti dei geni analizzati negli ovociti di prepubere in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2) e maturazione in vitro, espressa in unità densitometriche, come media \pm SEM. (a vs b vs c, $P < 0,05$, test del χ^2).

5- ESPERIMENTO 2

5.1 OBIETTIVO

Lo scopo di questo esperimento è stato quello di analizzare gli effetti dei due diversi protocolli di vitrificazione V1 e V2 sull'ovocita maturato in vitro (stadio di metafase II, MII) di pecora adulta e prepubere. In particolare, dopo il ripristino della temperatura ed 1 ora di incubazione in medium di maturazione sono state analizzate :

- 1) sopravvivenza dell'ovocita;
- 2) alterazioni dei cromosomi e delle componenti citoscheletriche (microtubuli e microfilamenti);
- 3) variazione dei pattern di espressione genica dell'ovocita (ciclina b, P34, Actb, Hook1, Kif11, Cirbp, Hsp90b, Sod1, Bax);
- 4) modificazioni dello stato ossido-riduttivo (valutazione della produzione di ROS e dell'attività mitocondriale).

5.2 DEFINIZIONE DEI GRUPPI SPERIMENTALI

Gli ovociti di pecora e adulta e prepubere maturati in vitro sono stati distribuiti in maniera randomizzata nei seguenti gruppi sperimentali:

- CTR: non sottoposti a vitrificazione (n=150);

Adulto: - V1: ovociti MII vitrificati secondo il sistema V1 (n=150);

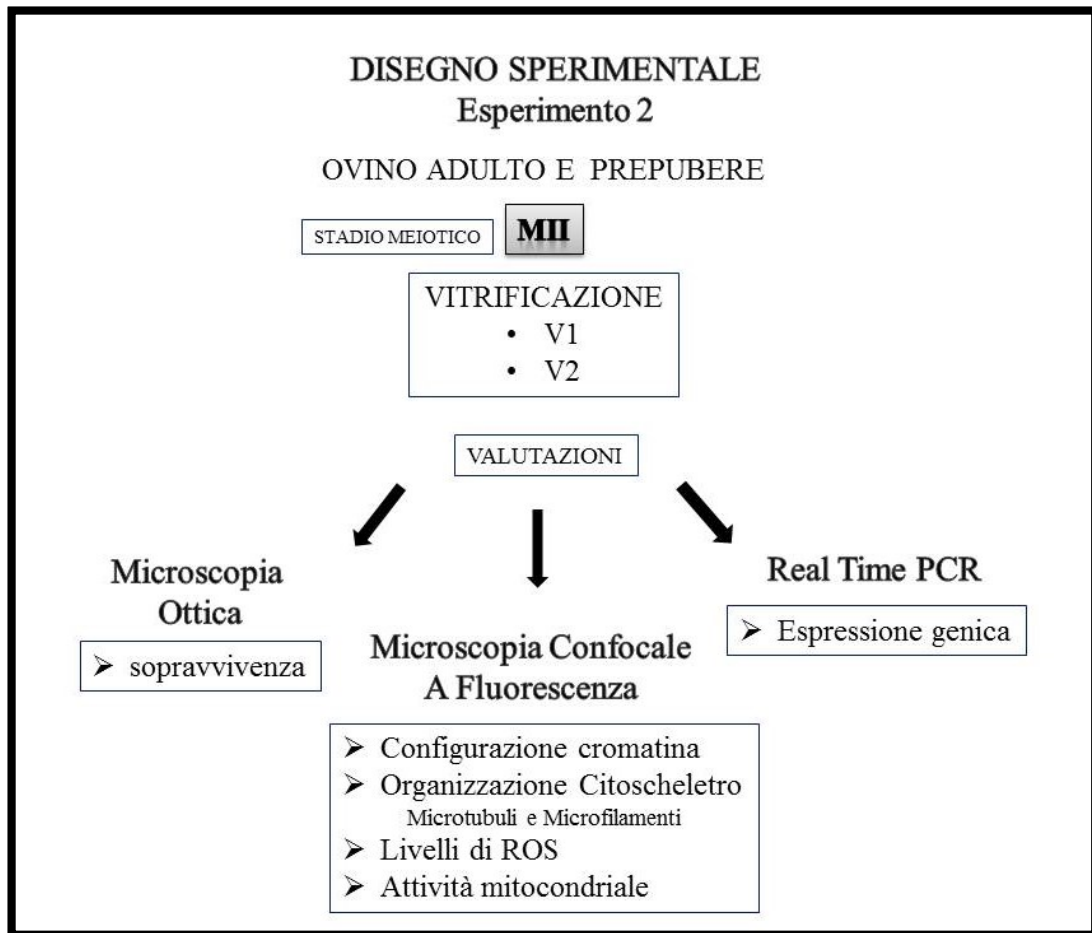
- V2: ovociti MII vitrificati secondo il sistema V2 (n=141);

- CTR: ovociti MII sottoposti a vitrificazione (n=150);

Prepubere: - V1: ovociti MII vitrificati secondo il sistema V1 (n=143);

- V2: ovociti MII vitrificati secondo il sistema V2 (n=137);

Gli ovociti dei differenti gruppi sperimentali sono stati processati per le analisi strutturali e molecolari secondo il seguente disegno sperimentale in base alla metodologia riportare nelle sezioni dei Materiali e Metodi.



5.3 RISULTATI

1) Valutazione della sopravvivenza

Come si evince dalla figura 5.2, la vitrificazione con il sistema V1 ha permesso di incrementare significativamente le percentuali di sopravvivenza degli ovociti di adulto (87,3%) e prepubere (90,21%) rispetto al sistema V2 (rispettivamente, 73,05% e 74,45%, $P < 0,05$) dopo il ripristino della temperatura.

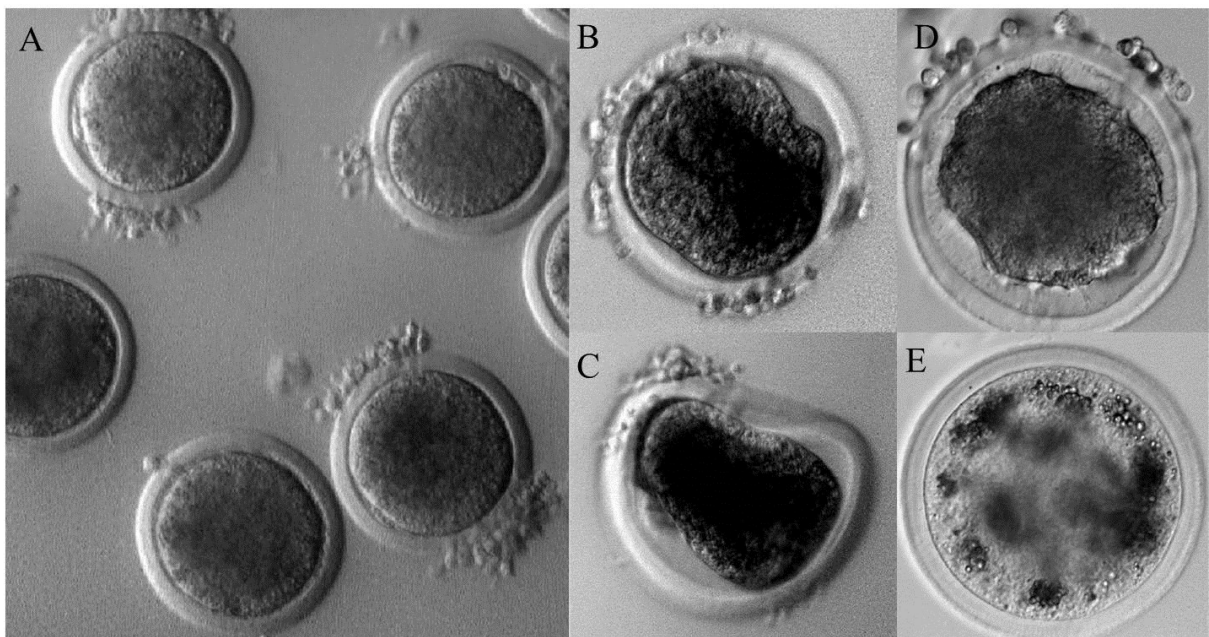


Fig 5.1: A) Ovociti di pecora maturati in vitro. B-C) Fasi di esposizione dell'ovocita ai crioprotettori. D-E) Forme di degenerazione osservate dopo il ripristino della temperatura.

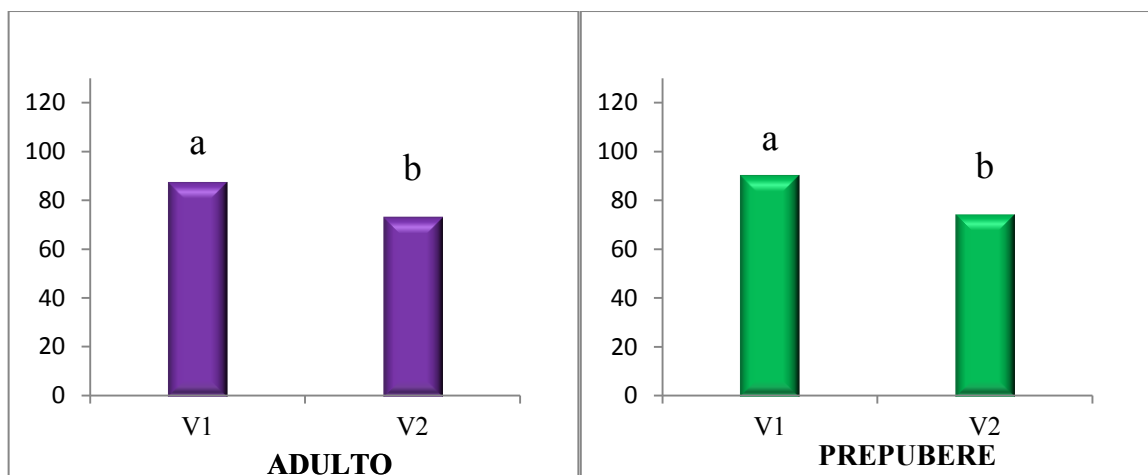


Fig 5.2: Sopravvivenza degli ovociti maturi di pecora adulta e prepubere dopo vitrificazione con due differenti sistemi (gruppi V1 e V2).

(a vs b vs c, $P < 0,05$, test del χ^2)

2) Valutazione della configurazione della cromatina ed analisi delle componenti citoscheletriche

Gli ovociti allo stadio di Metafase II di pecora adulta e prepubere dei differenti gruppi sperimentali (CTR n=96; V1 n=50; V2 n=35) e prepubere (CTR n=64; V1 n=31; V2 n=19) sono stati analizzati per valutare la configurazione della cromatina e delle componenti citoscheletriche.

2.1) Analisi della configurazione della cromatina

Nella pecora adulta, l'esame della configurazione della cromatina ha indicato che la vitrificazione, con il sistema V1 (80%) ha consentito di mantenere una regolare organizzazione della cromatina a livelli paragonabili con il gruppo CTR (92,72%), mentre, nel gruppo V2 è stato riportato un significativo decremento degli ovociti con normale configurazione cromatinica (67,86%, $P<0,05$).

Nell'animale prepubere, nei gruppi V1 (59,02%) e V2 (47,06%) le percentuali di ovociti con cromatina in assetto regolare sono risultate significativamente ridotte rispetto al CTR (93,02%, $P<0,05$). La vitrificazione non ha indotto incrementi dei tassi di attivazione partenogenetica spontanea.

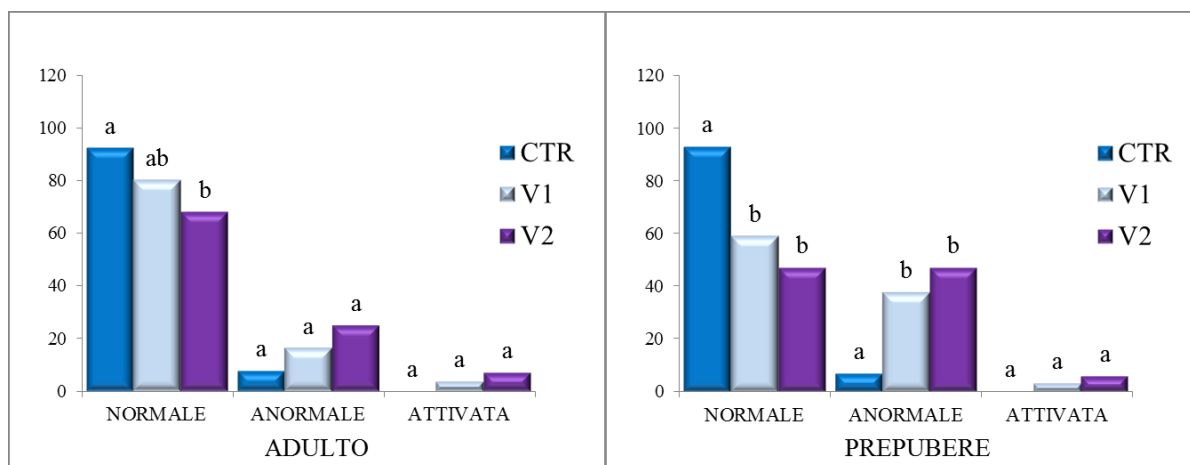


Fig 5.3: configurazione della cromatina degli ovociti di pecora adulta e prepubere in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2). (a vs b vs c, $P<0,05$, test del χ^2).

2.2) Morfologia del fuso meiotico

L'analisi del fuso meiotico degli ovociti di pecora adulta (Fig 5.4) ha rivelato che, dopo vitrificazione con sistema V1, le percentuali di ovociti con una regolare morfologia del fuso meiotico (80%) sono state simili al CTR (93,9%), mentre una significativa riduzione è stata osservata in seguito alla vitrificazione con metodo V2 (66,67% $P < 0,05$).

Negli ovociti di prepubere, le percentuali di configurazione regolare del fuso meiotico sono state ridotte dopo vitrificazione con entrambi i sistemi (V1:59,02%; V2:47,06%) rispetto al gruppo CTR (93,02%, $P < 0,05$).

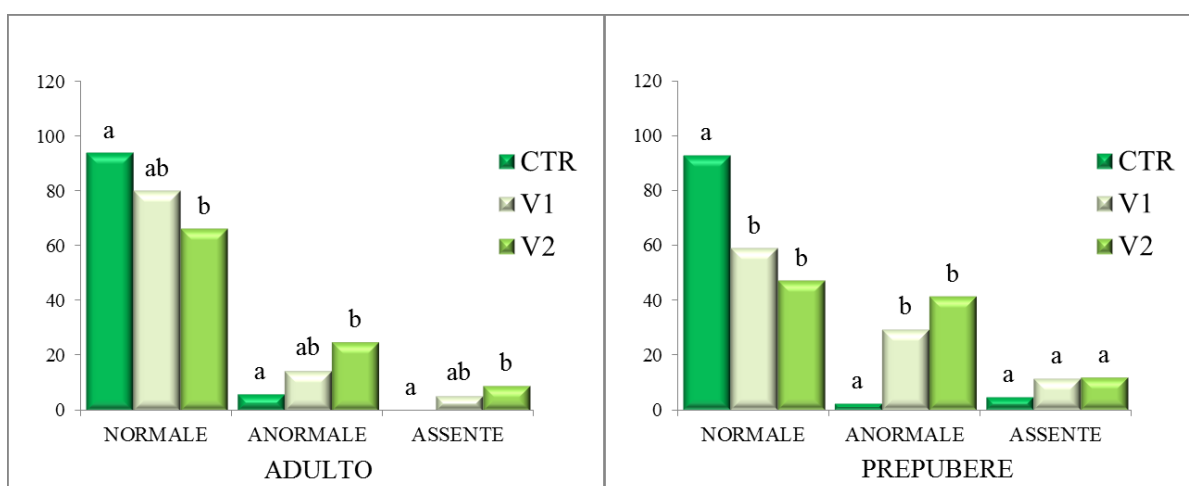


Fig 5.4: Configurazione del fuso meiotico degli ovociti di pecora adulta e prepubere in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2) (a vs b vs c, $P < 0,05$, test del χ^2).

2.3) Organizzazione dell'actina corticale

L'esame morfologico dell'actina corticale negli ovociti di adulto ha indicato che la vitrificazione con i sistemi V1 (63,3%) e V2 (25%) ha ridotto le percentuali di ovociti con una regolare configurazione del ring actinico rispetto al gruppo CTR (86,36%, $P < 0,05$).

Tuttavia, la vitrificazione con metodo V1 ha permesso di ottenere un risultato significativamente migliore rispetto al sistema V2 (rispettivamente, 63,6% vs 25%, $P < 0,05$).

Analogamente, negli ovociti di prepubere le percentuali di actina regolarmente distribuita sono state ridotte nei gruppi V1 (55,74%) e V2 (23,53%) rispetto al controllo (93,02%, $P < 0,05$), anche se la morfologia dei microfilamenti corticali è stata preservata maggiormente utilizzando il metodo V1 rispetto al sistema V2 ($P < 0,05$).

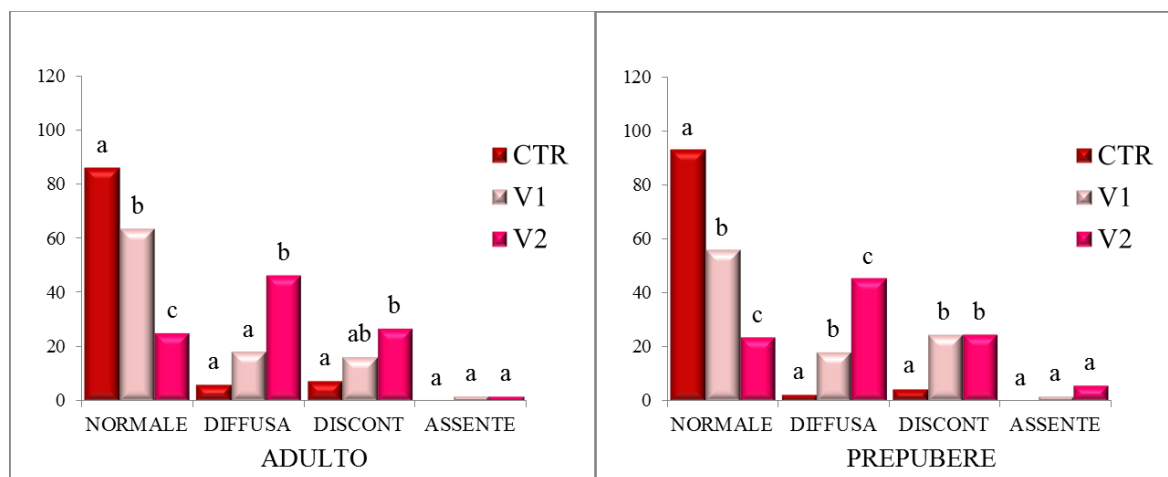


Fig 5.5: Configurazione dei microfilamenti nella cortex degli ovociti di pecora adulta e prepubere in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2). (a vs b vs c, $P < 0,05$, test del χ^2).

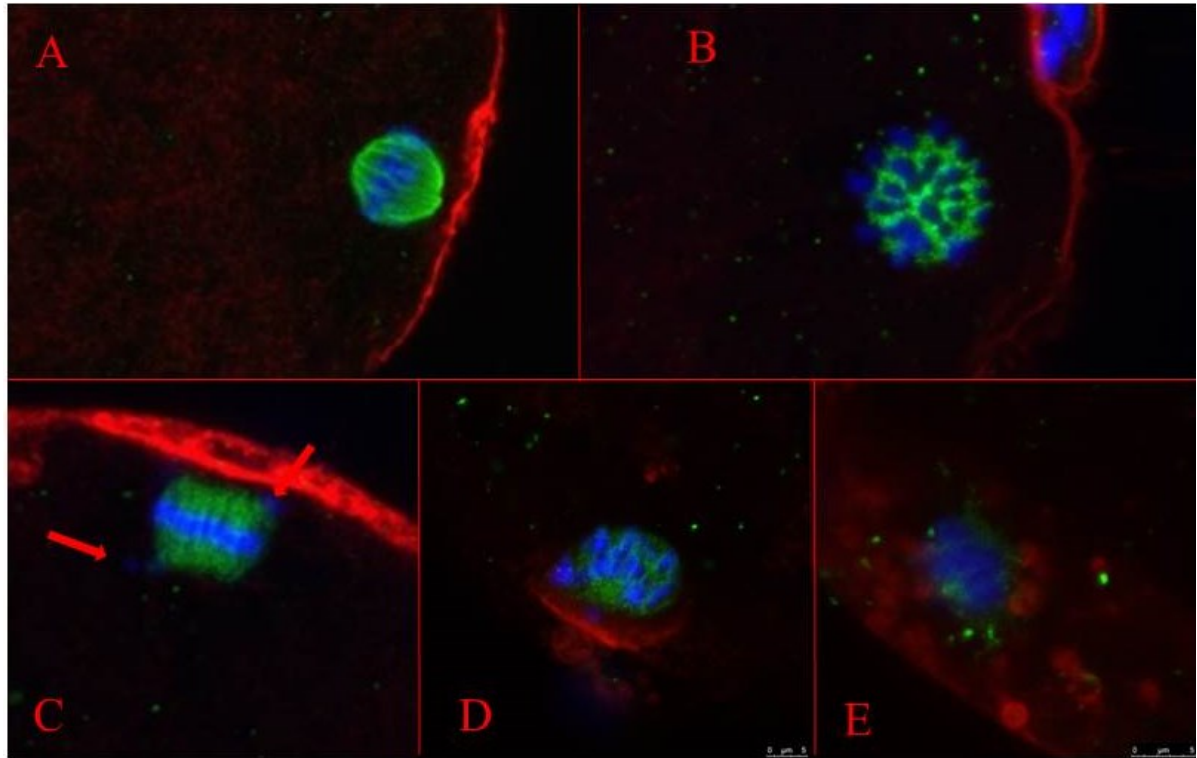


Fig 5.6: Configurazioni della cromatina e del fuso meiotico cromatina (blu) e tubulina (verde) ottenute tramite microscopia confocale a fluorescenza. A-B: Configurazione regolare di cromosomi e microtubuli: cromosomi ben allineati sulla piastra metafasica e microtubuli organizzati a formare un fuso regolare. C: Configurazione anormale: alcuni cromosomi sono dispersi e i microtubuli danno origine ad un fuso di forma inconsueta, appiattita. D: Configurazione anormale: cromosomi disallineati e microtubuli parzialmente depolimerizzati. E: Configurazione anormale: cromosomi decondensati e i microtubuli quasi totalmente depolimerizzati.

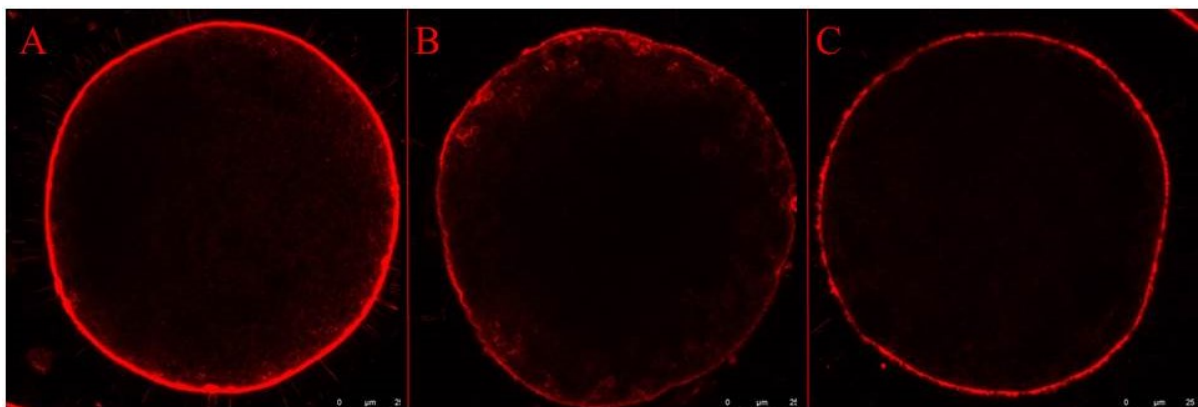


Fig 5.7: Distribuzione dei microfilamenti nella regione subcorticale dell'ovocita. Normale: Actina regolarmente distribuita nella regione corticale dell'ovocita (A); Anormale: Actina corticale diffusa e distribuita irregolarmente (B) Actina discontinua (C).

3) Analisi dell'espressione genica

La presenza di RNA messaggeri è stata rilevata per tutti i geni analizzati, sia in ovociti di animali adulti che di prepuberi.

L'analisi statistica dell'espressione genica condotta sugli ovociti di ovino adulto non ha evidenziato la presenza di differenze significative nei pattern di espressione dei geni ActB, Bax, Cirbp, Kif11, Ciclina B, Hsp90b e Sod1 (Fig 5.8). L'analisi ha, invece, indicato che il quantitativo relativo dei trascritti del gene Hook1 è stato significativamente inferiore nel gruppo V1 rispetto al gruppo V2 ($P < 0,05$); tuttavia, nessuna differenza è stata rilevata tra l'espressione del gene nei gruppi V1 e V2 comparativamente al controllo.

L'abbondanza relativa dei trascritti del gene P34 è stata significativamente ridotta nel gruppo V1 rispetto al gruppo CTR e rispetto agli ovociti vitrificati con metodo V2 ($P < 0,05$).

Negli ovociti di animale prepubere non sono state evidenziate differenze rilevanti nel quantitativo degli mRNA dei geni Bax, Sod1, Hsp90b, Hook1, ciclina b, P34 e Kif11. La vitrificazione con i metodi V1 e V2, ha causato un incremento dell'espressione del gene Actb rispetto al controllo ($P < 0,05$). Tale incremento è risultato maggiore negli ovociti vitrificati con metodo V2 rispetto al metodo V1 ($P < 0,05$). La vitrificazione con il sistema V2 ha determinato un aumento dell'espressione del gene Cirbp rispetto al gruppo CTR ($P < 0,05$).

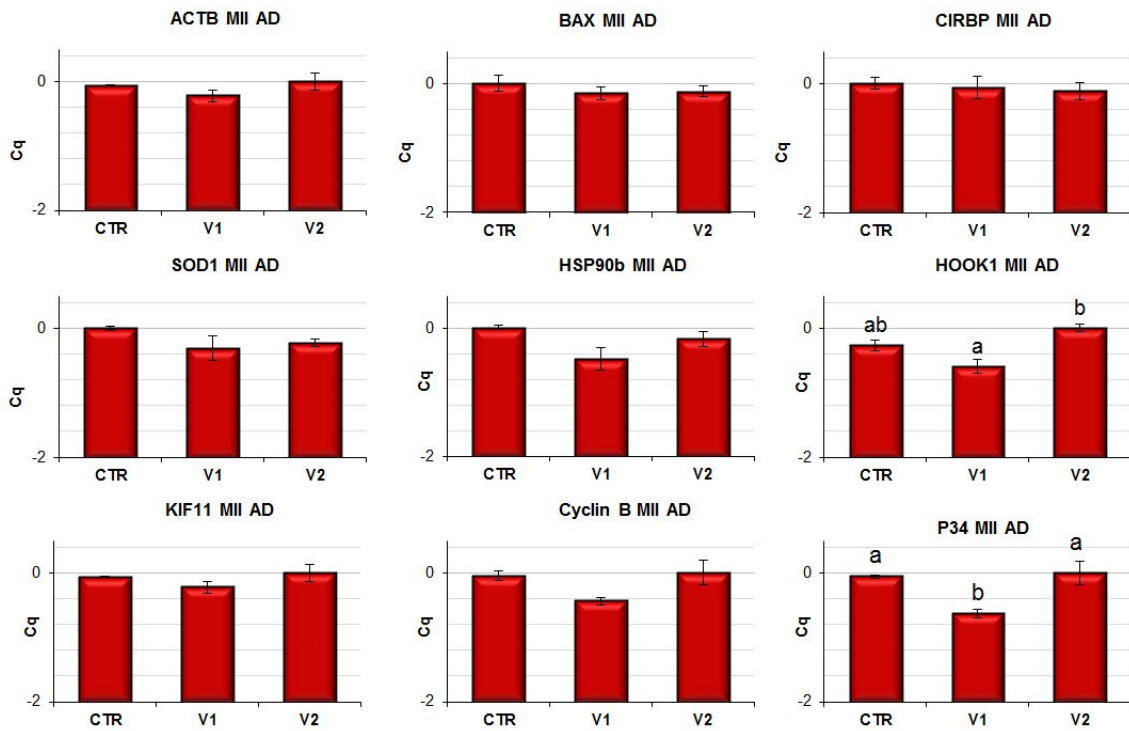


Fig 5.8: Rappresentazione grafica dell'abbondanza relativa dei trascritti dei geni analizzati negli ovociti di animale adulto, espressa in unità densitometriche, come media \pm SEM. (a vs b vs c, $P < 0,05$, test del χ^2).

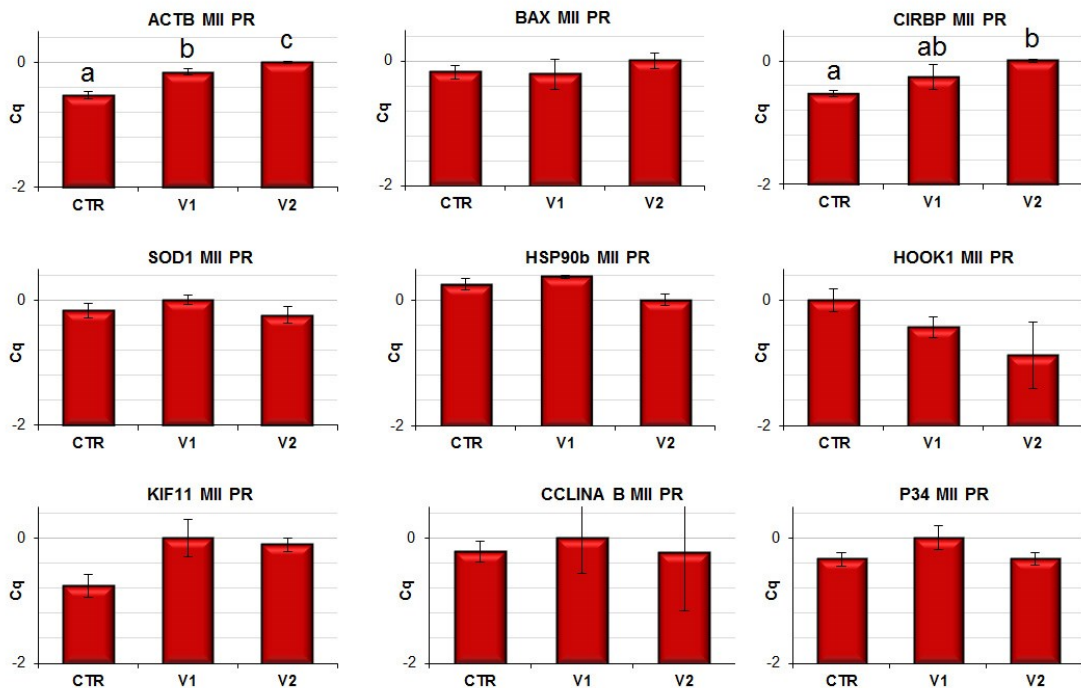


Fig 5.9: Rappresentazione grafica dell'abbondanza relativa dei trascritti dei geni analizzati negli ovociti di animali prepuberi, espressa in unità densitometriche, come media \pm SEM. (a vs b vs c, $P < 0,05$, test del χ^2).

4) Analisi delle modificazioni dello stato ossido-riduttivo

4.1) Analisi dei livelli di ROS

L'analisi dell'intensità della fluorescenza, relativa alla colorazione degli ovociti vitrificati con 2',7'-diclorodidrofluoresceina diacetato (H₂DCF-DA), non ha mostrato nell'ovocita di adulto differenze significative nei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) tra i gruppi CTR, V1 e V2 (Fig 5.11).

Nell'animale prepubere, al contrario, l'incremento dei livelli di ROS è stato riscontrato in entrambi i gruppi V1 e V2, significativamente maggiori rispetto al controllo (P<0,05).

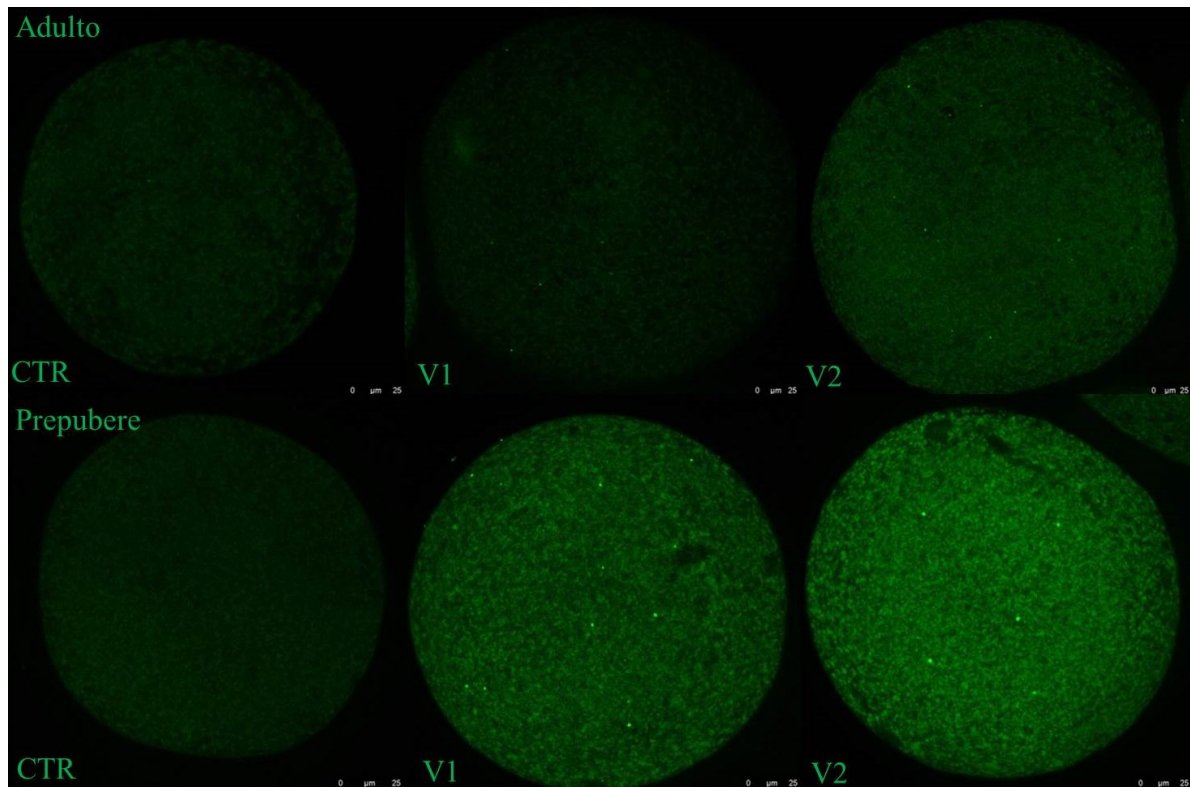


Fig 5.10: Distribuzione dei ROS degli ovociti di pecora adulta e prepubere in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2)

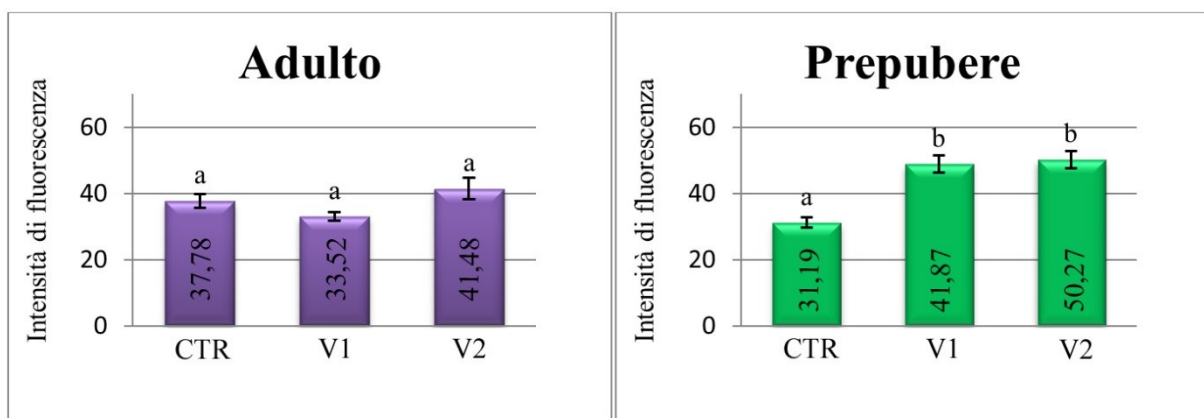


Fig 5.11: Livelli intracellulari di ROS degli ovociti di pecora adulta e prepubere in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2).
(a vs b vs c, $P < 0,05$).

4.2) Valutazione dell'attività mitocondriale

La colorazione con Mitotracker Orange degli ovociti di pecora adulta ha mostrato che il pattern di distribuzione dei mitocondri è stato alterato dalla vitrificazione con i metodi V1 e V2. Gli ovociti del gruppo CTR, erano caratterizzati da una distribuzione omogenea dei mitocondri in tutto il citoplasma (Fig 5.12). Dopo vitrificazione con sistema V1, invece, è stata osservata la presenza di aggregati mitocondriali di medie dimensioni. La vitrificazione con metodo V2 ha alterato in maniera più rilevante il pattern di distribuzione mitocondriale, caratterizzato da piccoli cluster mitocondriali in tutto il citoplasma. I livelli di attività mitocondriale registrati dopo vitrificazione sono risultati maggiori del gruppo CTR in entrambi i sistemi V1 e V2. Tuttavia, il sistema V2 ha determinato un maggiore incremento dell'attività mitocondriale rispetto al sistema V1 ($P < 0,05$).

Le modificazioni della distribuzione dei mitocondri osservate nell'ovocita di animale prepubere sono risultate assimilabili a quelle dell'ovocita dell'animale adulto. I livelli di attività mitocondriale sono aumentati in maniera significativa nei gruppi V1 e V2 ($P < 0,05$).

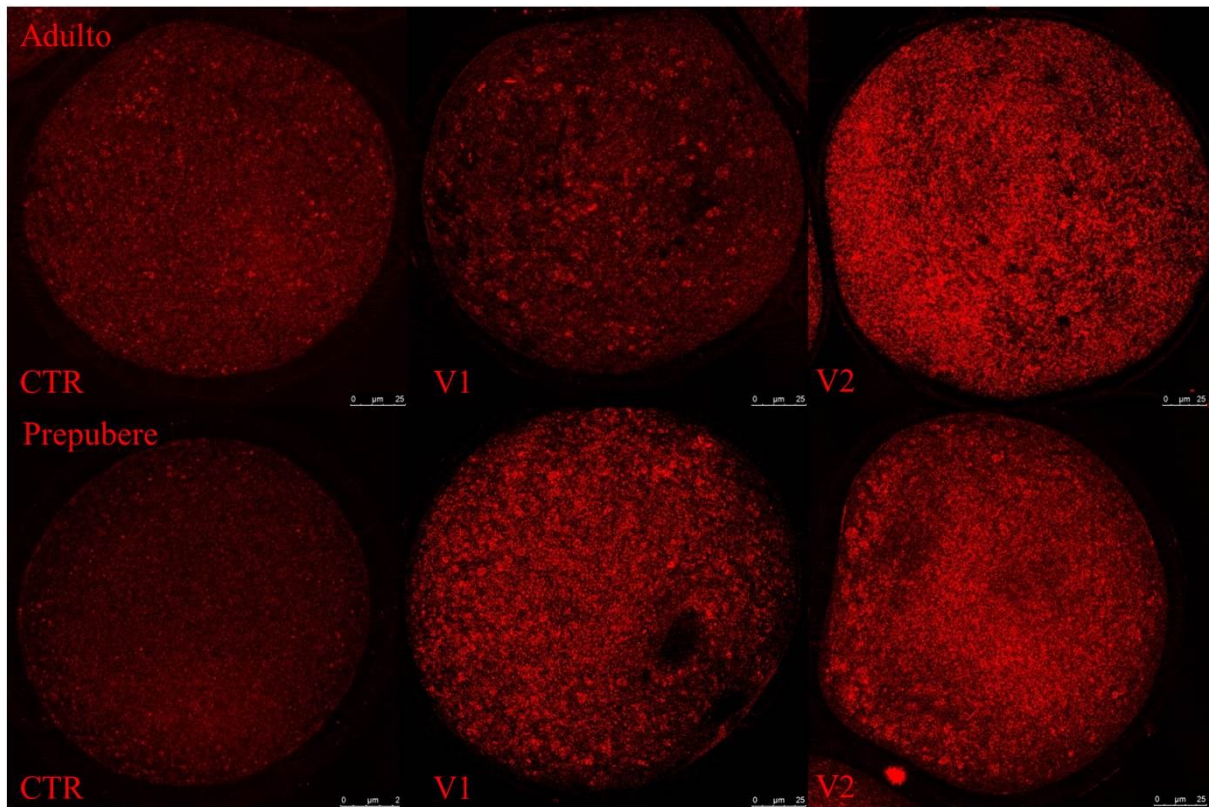


Fig 5.12: Distribuzione dei mitocondri degli ovociti di pecora adulta e prepubere in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2).

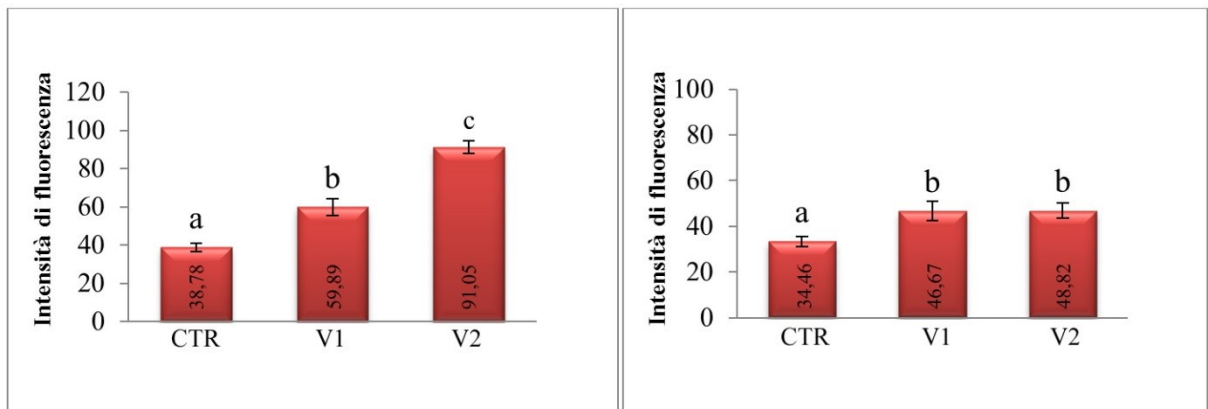


Fig 5.13: Attività mitocondriale degli ovociti di pecora adulta e prepubere in seguito a vitrificazione con due differenti sistemi (V1 e V2).

(a vs b vs c, $P < 0,05$).

6 - ESPERIMENTO 3

6.1 OBIETTIVO: Lo scopo di questo esperimento è stato quello di esplorare le potenzialità della Microspettroscopia Raman come metodica d'indagine non invasiva per lo studio delle modificazioni del cortex ovocitario, con particolare riferimento ai microfilamenti di actina. A questo proposito, la RMS è stata applicata all'analisi di ovociti maturati in vitro, vitrificati ed esposti alle soluzioni di vitrificazione. Poiché l'interesse di questo studio è stato rivolto prevalentemente alla realizzazione di esperimenti preliminari per esplorare l'applicabilità della tecnica, le analisi sono state condotte su ovociti maturati in vitro di pecora adulta, utilizzando esclusivamente il protocollo di vitrificazione V2.

6.2 METODOLOGIA

I COCs di pecora adulta sono stati maturati in vitro fino allo stadio di metafase II e distribuiti nei seguenti gruppi sperimentali:

- (1) Ovociti di controllo: ovociti non trattati (CTR);
- (2) Ovociti esposti ai crioprotettori (CPA-exp, n=10): gli ovociti sono stati sottoposti alla procedura di vitrificazione/scongellamento/reidratazione secondo il protocollo V2, escludendo l'immersione in azoto liquido;
- (3) Ovociti vitrificati (VITRI, n=10) secondo il protocollo V2.

La vitrificazione ed esposizione ai crioprotettori è stata condotta utilizzando il sistema di vitrificazione V2, descritto in dettaglio nella sezione Materiali e Metodi. Gli ovociti sono stati successivamente processati per le analisi Raman, secondo la metodologia riportata di seguito.

6.2.1 Trattamento con Latrunculina-A (LATA)

Poiché lo spettro Raman proveniente dalla regione corticale degli ovociti è relativamente complesso, è stato eseguito uno studio preliminare per identificare regioni dello spettro che potrebbero essere riconducibili alla F-actina. A questo scopo, in un gruppo di ovociti in MII (LATA, n=10) i microfilamenti di actina sono stati depolimerizzati attraverso l'incubazione con Latrunculina-A (LATA) 200 μM in medium di maturazione per 4h, a 38,5°C e al 5% di CO_2 . La LATA è una sostanza in grado di depolimerizzare reversibilmente l'actina filamentosa formando legami 1:1 con l'actina globulare (G-actina) (Spector et al., 1983, 1989). Un gruppo di ovociti non trattati è stato utilizzato come controllo (CTR-LATA, n=10). I gruppi CTR-LATA e LATA sono stati analizzati tramite RMS al fine di identificare le differenze spettrali presenti tra i due gruppi.

6.2.2 Preparazione degli ovociti per l'analisi RMS

Tutti gli ovociti sono stati fissati per 30 minuti in una soluzione al 4% (w/v) di paraformaldeide (PFA). Davidson et al., hanno dimostrato che la fissazione in PFA, piuttosto che in altri fissativi, permette l'acquisizione di spettri Raman che sono globalmente più simili a quelli ottenuti da campioni vitali. Dopo la fissazione, i campioni sono stati lavati in PBS e stoccati a 4°C fino al momento dell'analisi. L'analisi RMS è stata condotta posizionando ciascun ovocita in una goccia da 100 μL di PBS, coperta da olio minerale su un vetrino di quarzo.

6.2.3 Misurazioni RMS

Le misurazioni sono state effettuate utilizzando un microscopio confocale Raman Bruker Senterra, utilizzando un obiettivo ad immersione ad acqua (apertura numerica 1,1; distanza di

lavoro 1,5 mm) una lunghezza d'onda di eccitazione di 532 nm ad una potenza di 25 mW.

1) Scansioni puntiformi

Le misurazioni sono state condotte focalizzando il laser su 12 punti della regione subcorticale dell'ovocita, appena al di sotto della membrana plasmatica (Fig. 6.1A). Lo spettro finale ottenuto da ciascun punto è stato ottenuto dalla media di 6 acquisizioni di 3 secondi ciascuna alla risoluzione di 9-15 cm^{-1} . Infine, lo spettro di ciascun ovocita è stato ottenuto mediando i 12 spettri medi acquisiti lungo la regione subcorticale. L'acquisizione ha richiesto circa 3-5 minuti per ovocita.

2) Imaging di singoli ovociti

Per ciascun gruppo sperimentale è stata ottenuta una mappatura chimica di un ovocita, definendo una griglia di acquisizione di 70x70 μm equi-distanziati di 2,5 μm (Fig. 6.1B). Lo spettro di ciascun punto della griglia è stato ottenuto dalla media di 5 acquisizioni da 5 secondi. L'acquisizione ha richiesto circa 5h. Abbiamo scelto di mappare solo una porzione dell'ovocita al fine di ridurre il tempo di acquisizione necessario per mappare l'intero ovocita (20h circa), riducendo il rischio di movimenti del campione.

Al termine delle misurazioni Raman, gli ovociti dei gruppi CTR, LATA, CTR-Exp e VITRI sono stati processati per la marcatura fluorescente dell'actina corticale e l'osservazione tramite microscopia confocale a fluorescenza, secondo la metodica indicata nella sezione Materiali e Metodi.

6.2.4 Analisi dei dati

Gli spettri ottenuti dai diversi gruppi sperimentali sono stati analizzati attraverso l'analisi delle componenti principali (PCA) nella regione spettrale compresa tra $1,800-600\text{ cm}^{-1}$. Uno smoothing di 17 punti è stato applicato agli spettri medi e la PCA è stata applicata alla derivata seconda degli spettri. I dati sono stati rappresentati attraverso score plot, in cui gli spettri sono stati rappresentati da singoli punti in uno spazio multivariato; i loading plot sono stati utilizzati per individuare le maggiori differenze all'interno delle componenti principali. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il pacchetto OPUS-Quant del software Bruker OPUS 6.5. Per valutare la distribuzione delle proteine, da ogni ovocita è stata generata una mappa a falsi colori integrando la regione spettrale a 1657 cm^{-1} (Amide I) e $1266/1300\text{ cm}^{-1}$ (Amide III).

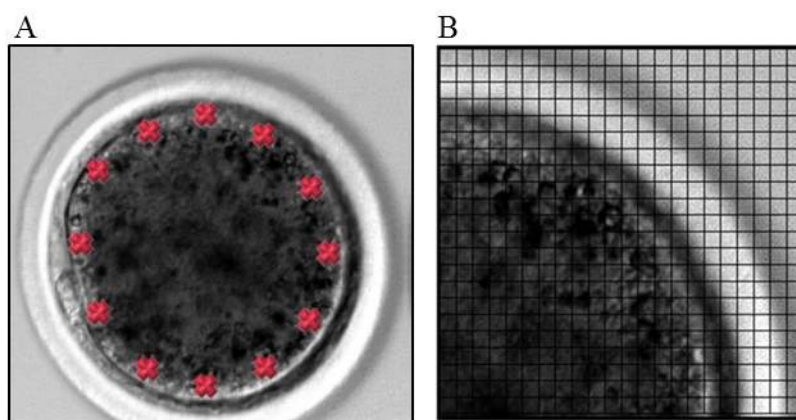


Fig:6.1 Descrizione delle misure effettuate tramite RMS tramite (A) scansioni puntiformi nella regione corticale dell'ovocita e tramite (B) la definizione di una griglia di scansione per ricavare la mappa di un quadrante dell'ovocita.

6.3 RISULTATI

1) Trattamento con LATA

La figura 6.2A mostra gli spettri medi ottenuti tramite le acquisizioni puntiformi dagli ovociti CTR-LATA e LATA, nel range dello spettro che va da 1800-600 cm^{-1} . La PCA è stata eseguita su una matrice di dati che conteneva 20 spettri medi ottenuti dall'analisi dei due gruppi CTR-LATA (n=10) e LATA (n=10). Lo score plot ottenuto tramite PCA (Fig 6.2B) evidenzia che gli spettri ottenuti dal gruppo LATA sono chiaramente distinti da quelli ottenuti dal gruppo CTR-LATA. Il loading plot (Fig 6.2C) ha indicato che la natura delle variazioni nelle componenti chimiche tra i due gruppi è riconducibile alla presenza di picchi positivi nelle regioni 1657 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1266/1300 cm^{-1} . Queste regioni degli spettri Raman sono principalmente riconducibili alle vibrazioni molecolari dei legami proteici (Matthaus et al., 2008). I picchi a 1657 cm^{-1} e 1266/1300 cm^{-1} derivano, rispettivamente, dalla vibrazione dell'amide I e amide III delle proteine e sono riferibili alla struttura secondaria delle proteine. La banda a 1440 cm^{-1} deriva dal bending del gruppo CH₂ e dalla deformazione del gruppo CH₃ di proteine e lipidi. Dal momento che l'actina è uno dei principali rappresentanti nel contenuto proteico totale del cortex dell'ovocita in MII, le differenze vibrazionali osservate tra i gruppi CTR-LATA e LATA potrebbero essere ricondotte ai cambiamenti indotti nella F-actina dal trattamento con LATA. Le immagini ottenute tramite microscopia confocale a fluorescenza sono in linea con i risultati dell'analisi RMS. Infatti, la colorazione della F-actina degli ovociti LATA è risultata molto poco intensa rispetto agli ovociti CTR-LATA, in cui, al contrario, la F-actina appariva intensamente colorata e uniformemente distribuita al di sotto dell'oolemma (Fig 6.2D).

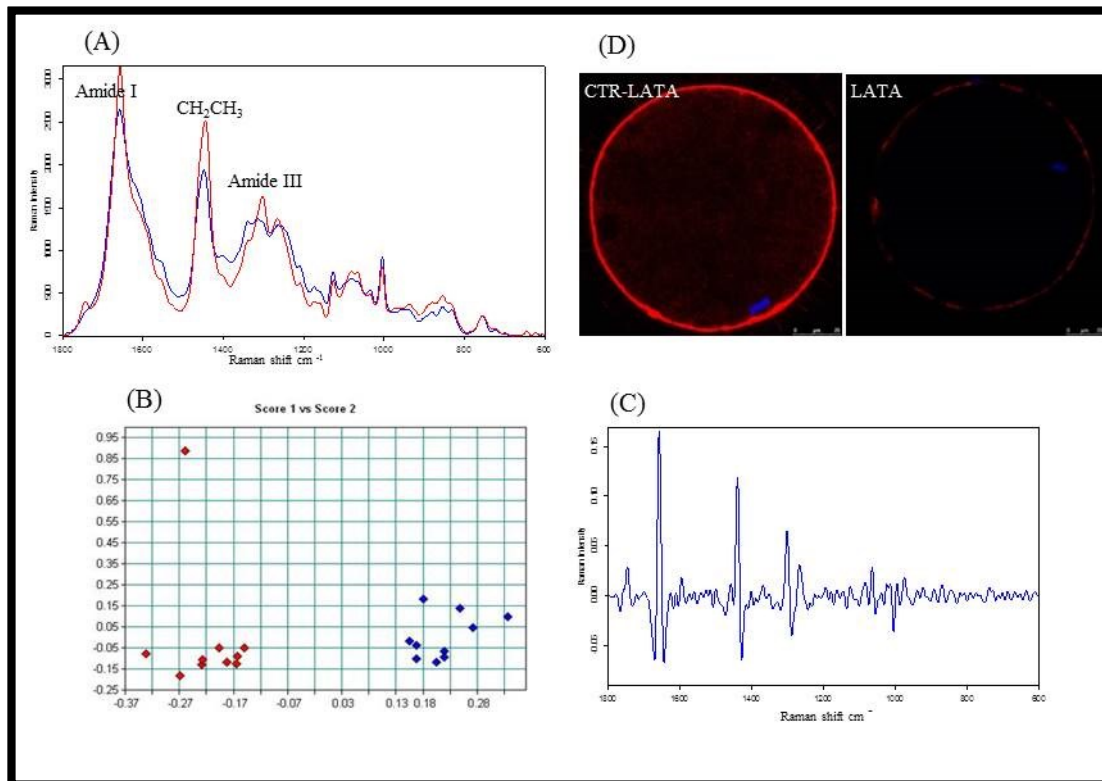


Fig.6.2 (A) Spettri medi ottenuti dalle scansioni lineari degli ovociti CTR-LATA (rosso) e LATA (blu) nel range spettrale di $1,800-600\text{ cm}^{-1}$; (B) Loading plot (PC1 vs PC2) e (C) loading plot (PC2) ottenuti tramite PCA applicata alla derivata seconda degli spettri delle due classi sperimentali. (D) Colorazione tramite immunofluorescenza della F-actina: distribuzione normale della F-actina di un ovocita maturato in vitro (CTR-LATA) e distribuzione discontinua e a bassa intensità dopo il trattamento con latrunculina A (LATA).

2) Esposizione ai crioprotettori e vitrificazione

La figura 6.3A mostra gli spettri medi nel range $1,800-600\text{ cm}^{-1}$ dei gruppi CTR, CPA-exp e VITRI ottenuti dalle scansioni puntiformi della regione subcorticale. La PCA è stata eseguita su una matrice di dati composta da 30 spettri medi collezionati dall'analisi dei gruppi CTR (n=10), CPA-exp (n=10) e VITRI (n=10). Gli score plots (fig 6.3B) hanno mostrato una marcata discriminazione tra il gruppo CTR e i gruppi CPA-exp/VITRI. Nessuna differenza è stata trovata tra i gruppi CPA-exp e VITRI negli spettri Raman. Le maggiori differenze sono state evidenziate dai loading plot (Fig 6.3C) nella vibrazione delle componenti proteiche

(1657 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} e 1330 cm^{-1}). Come suggerito dall'esperimento preliminare precedente, le maggiori differenze potrebbero essere indicative di cambiamenti nella F-actina del cortex. Questi cambiamenti sono stati confermati dall'analisi degli ovociti CPA-exp e VITRI tramite microscopia confocale e colorazione dell'actina filamentosa. Tutti gli ovociti CPA-exp e VITRI hanno mostrato pattern abnormali nell'organizzazione della F-actina, che appariva irregolare o discontinua (Fig. 6.3D, b-c) rispetto al CTR in cui l'actina risultava organizzata in maniera regolare (Fig. 6.3D, a).

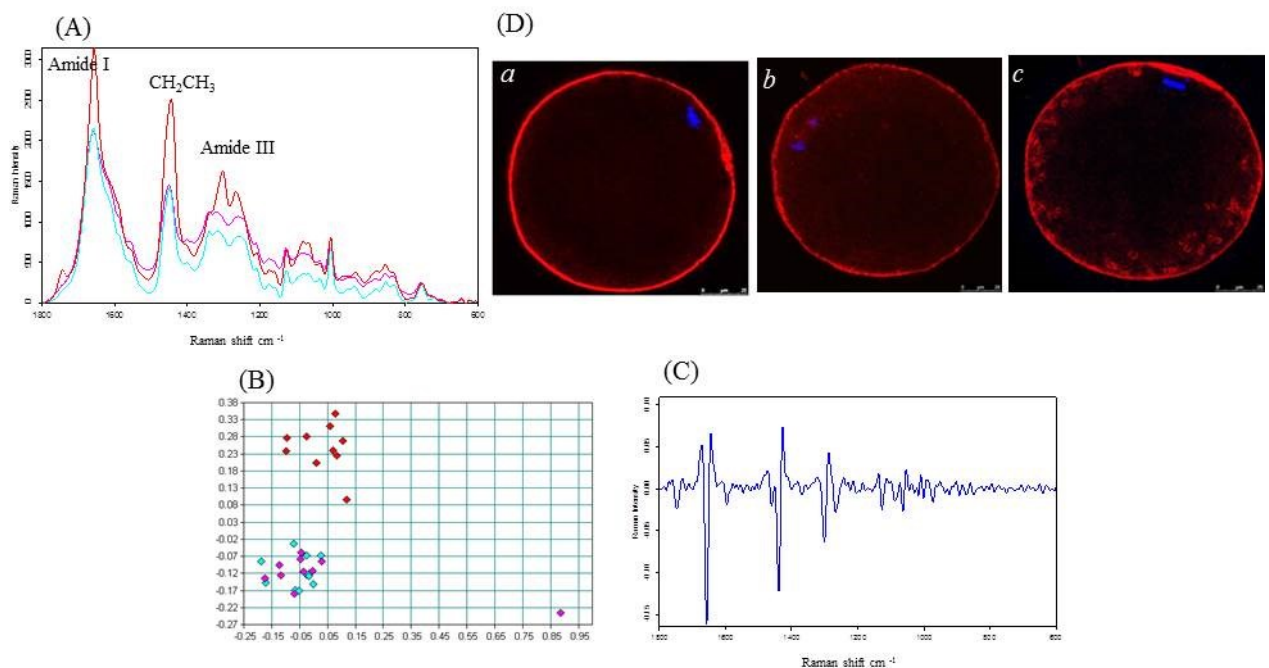


Fig.6.3: (A) Spettri medi ottenuti dalle scansioni puntiformi di ovociti CTR (rosso), CPA-exp (rosa) e VITRI (blu) nella regione spettrale di 1,800–600 cm^{-1} ; (B) Score plot (PC1 vs PC2) e (C) loading plot (PC2) ottenuti tramite PCA, applicata alla derivata seconda degli spettri delle tre classi sperimentali. Ciascun punto rappresenta lo spettro medio ottenuto da ciascun ovocita. (D) pattern di distribuzione dei microfilamenti di actina nella regione corticale dell'ovocita visualizzata tramite microscopia confocale a fluorescenza: a) configurazione normale, in cui il network di actina è omogeneamente distribuito al di sotto della membrana plasmatica; b) distribuzione discontinua e poco colorata dell'actina; c) distribuzione irregolare e diffusa.

3) RMS Imaging e immunofluorescenza dell'actina

La fig. 6.4 rappresenta le immagini ottenute tramite microscopia ottica, confocale a fluorescenza e mappa a falsi colori degli spettri Raman di un quadrante degli ovociti appartenenti ai gruppi sperimentali CTR, CPA-exp e VITRI. La mappa Raman è stata ottenuta integrando la regione dello spettro Raman corrispondente all'Amide I (Fig. 6.4, g,h,i) e all'Amide III (Fig 6.4, l,m,n) che sono indicativi della distribuzione delle componenti proteiche di ogni campione. Può essere chiaramente osservato che, sebbene le proteine siano distribuite in tutto il citoplasma, maggiori intensità sono visibili nel cortex degli ovociti, al di sotto della membrana plasmatica. Il confronto tra le immagini a fluorescenza della F-actina (Fig. 6.4, Panel d-f) e le immagini Raman (Fig. 6.4, Panel g-n) mostrano un buon grado di similitudine a livello della regione corticale, suggerendo che l'actina potrebbe essere il maggior costituente delle bande Raman corrispondenti alle vibrazioni molecolari delle componenti proteiche. L'esposizione ai CPA e la vitrificazione inducono alterazioni nel pattern proteico del cortex dell'ovocita e determinano alterazioni nel network di actina.

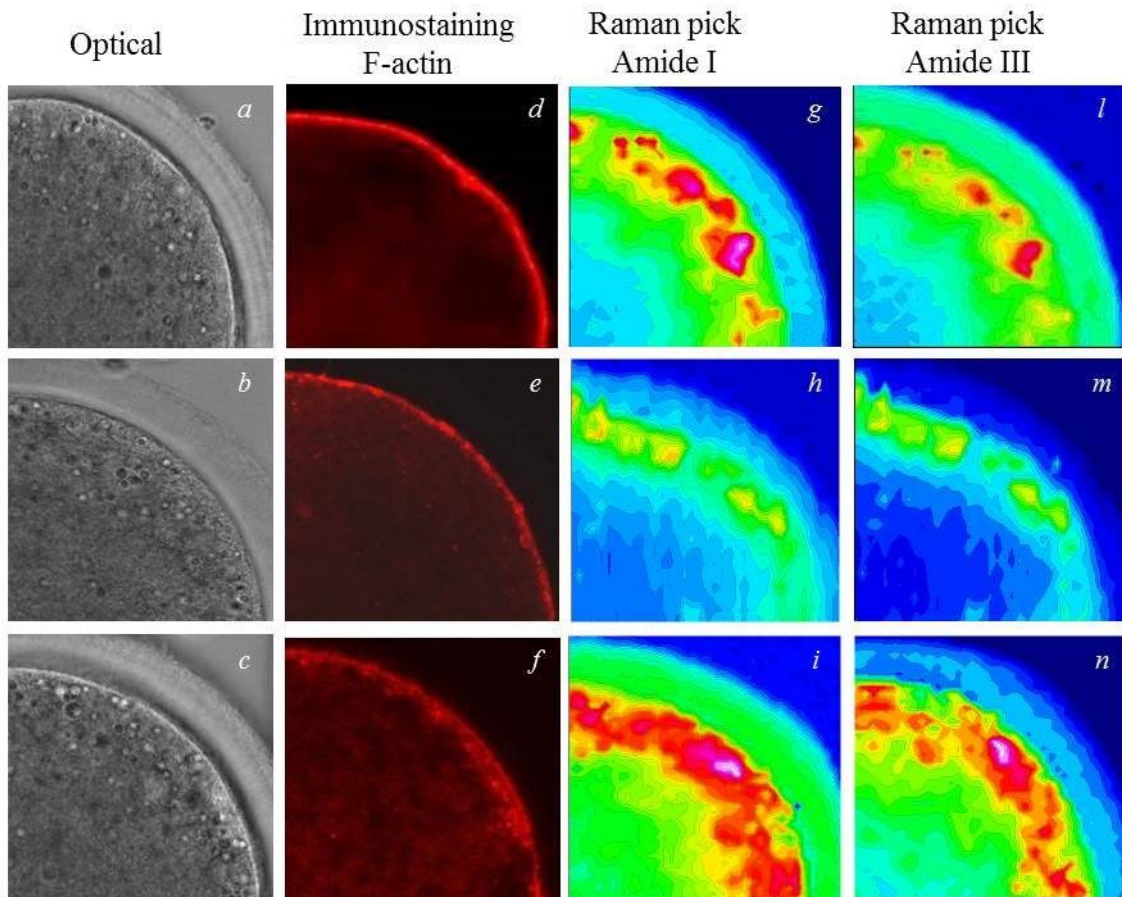


Fig.6.4: Il pannello mostra le immagini ottenute tramite microscopia ottica (a,b,c), tramite microscopia a fluorescenza (in cui si può notare actina in conformazione normale (d) e anormale (e,f)) e immagini ottenute tramite la costruzione di mappe Raman a falsi colori riferibili alle intensità delle bande Amide I (ghi) e Amide III (l,m,n).

7 - DISCUSSIONE

Attualmente, la vitrificazione si pone come la tecnica più promettente per la crioconservazione dell'ovocita. Tuttavia, mentre in campo umano tale tecnica è considerata ormai standardizzata e applicata con successo nella pratica clinica (Cobo et al., 2011), in campo veterinario essa rimane ancora poco soddisfacente. Le attuali evidenze indicano come tale procedura richieda ancora consistenti miglioramenti. I risultati ottenuti variano da specie a specie e, talvolta, anche all'interno della stessa specie. Variabili quali, età dell'animale, specie, tecnica di vitrificazione utilizzata, rendono i risultati di difficile interpretazione.

Differenti strategie sono state sperimentate per incrementare la vitalità e competenza allo sviluppo embrionale dell'ovocita vitrificato, quali l'impiego di crioprotettori, tempi di esposizione e devices differenti, cambiamenti del contenuto lipidico dell'ovocita (Nagashima et al., 1999; Ushijima et al., 1999; Men et al., 2006), pre-trattamento con inibitori del citoscheletro (Fujihira et al., 2004; Mailhes et al., 1999; Hosu et al., 2008), ma nel complesso i risultati denotano profonde alterazioni funzionali, morfologiche, strutturali e molecolari dell'ovocita vitrificato, che si riflettono in una ridotta competenza di sviluppo embrionale. Le alterazioni dell'ovocita possono insorgere in tutte le fasi delle procedure di crioconservazione: l'esposizione ai CPAs, le fasi di raffreddamento e di ripristino della temperatura. Le forze osmotiche generate durante i cicli di disidratazione-reidratazione, la tossicità dei crioprotettori, possono disturbare la funzionalità di diversi organuli dell'ovocita, la struttura del fuso mitotico e della cromatina dell'ovocita nonché indurre modificazioni delle componenti molecolari, che incidono sulle percentuali di sopravvivenza allo scongelamento e sulla competenza allo sviluppo embrionale.

Allo scopo di pervenire ad un miglioramento della crioconservazione dell'ovocita animale e cercare di minimizzare i danneggiamenti indotti dalla tossicità dei crioprotettori e dal trattamento ipotermico, la presente ricerca ha previsto la sperimentazione di un protocollo di

vittrificazione multi-steps (V1) progettato in modo da creare un'esposizione graduale e dinamica del gamete femminile a gradienti di concentrazioni crescenti di crioprotettori. Infatti, recenti evidenze dimostrano che l'utilizzo di strategie che limitino lo stress osmotico e l'eccessiva contrazione del volume cellulare, in risposta a sollecitazioni osmotiche, possono favorire il successo della crioconservazione (Heo et al., 2011). Tale sistema è stato testato comparativamente ad sistema classico two steps (V2) (Kuwayama et al., 2005), impiegando ovociti di animali adulti e prepuberi allo stadio di vescicola germinale e in metafase II. La scelta dello stadio meiotico ottimale per la vittrificazione è, infatti, ancora un dibattito aperto nella letteratura scientifica.

Sebbene la vittrificazione dell'ovocita immaturo abbia indotto severe alterazione delle componenti strutturali citoplasmatiche in entrambi i sistemi utilizzati, con rotture della membrana plasmatica e conseguente degenerazione dell'ovocita, l'esposizione graduale e dinamica ai crioprotettori del sistema V1 ha permesso di migliorare la sopravvivenza degli ovociti rispetto al sistema V2 (esperimento 1). Il principale bersaglio dell'insulto osmotico e termico è la membrana plasmatica. L'ovocita, esposto a soluzioni di vittrificazione iperosmotiche durante la fase di disidratazione, non riesce a mantenere la sua forma e può verificarsi la rottura della membrana plasmatica.

La crioconservazione del complesso cumulo-ovocita è generalmente una procedura di difficile successo, poiché è spesso accompagnata da una diminuzione della competenza meiotica dell'ovocita. E' ben noto che la competenza allo sviluppo viene acquisita durante il processo di maturazione citoplasmatica, attraverso una serie di rimodellamenti strutturali e molecolari nel citoplasma ovociti, che si accompagna alla maturazione meiotica. Variazioni dell'assetto cellulare e molecolare indotte durante la maturazione possono influenzare negativamente tale acquisizione di competenza.

Negli ovociti di adulto e prepubere è stata osservata una riduzione della progressione

meiotica fino allo stadio di metafase seconda, dopo maturazione in vitro dell'ovocita vitrificato, indipendentemente dal sistema di vitrificazione utilizzato. La difficoltà dell'ovocita crioconservato nella ripresa meiotica e nel raggiungimento della maturazione è stata ampiamente documentata in varie specie, tra cui ovino (Bogliolo et al., 2007; Ebrahimi et al., 2010a; Ebrahimi et al., 2010b; Moawad et al., 2012; Fernandez Reyes et al., 2012; Moawad et al., 2013a) uomo (Mohsenzadeh et al., 2012; Yazdanpanah et al., 2013; Shahedi et al., 2013), bovino (Sripunya et al., 2014; Aono et al., 2013; Chen et al., 2014) e suino (Casillas et al., 2014, Gupta et al., 2007). Tuttavia, i risultati ottenuti nella presente ricerca, in seguito all'utilizzo del sistema V1, hanno consentito di ottenere, nell'adulto, percentuali di maturazione nucleare tendenzialmente più alte rispetto a quanto riportato da altri autori (Bogliolo et al., 2007; Ebrahimi et al., 2010a; Ebrahimi et al., 2010b; Moawad et al., 2012; Fernandez Reyes et al., 2012; Moawad et al., 2013a). In particolare, la riduzione della competenza meiotica riportata da alcuni autori sembrerebbe ascrivibile ad un maggiore stress osmotico, legato all'esposizione a basse concentrazioni di crioprotettori durante la fase di equilibratura (EG, 4%, 5%), seguita da un'esposizione a concentrazioni elevate (EG, 35%) della soluzione di vitrificazione (Moawad et al., 2012; Fernandez-Reyes et al., 2012). Verosimilmente, l'effetto dello stress osmotico di tale sistema di vitrificazione potrebbe aver contribuito a determinare un maggiore danneggiamento strutturale e molecolare, diminuendo la capacità dell'ovocita di riprendere e completare il processo di maturazione.

La scarsità di studi sulla vitrificazione dell'ovocita di ovino prepubere, rende i risultati ottenuti difficilmente comparabili. Nell'unico lavoro presente in letteratura (Silvestre et al., 2006), sono stati riportati valori di ripresa meiotica inferiori (12,5%) a quelli ottenuti in questa sperimentazione (V1: 44,29% e V2:35,19%), nonostante siano state utilizzate le medesime concentrazioni di crioprotettori del sistema V2. Queste differenze potrebbero essere attribuibili al diverso tempo di esposizione e al differente device utilizzato (OPS).

Il danneggiamento delle connessioni tra cellule del cumulo ed ovocita, indotto dalla vitrificazione, gioca un ruolo chiave nella riduzione della competenza meiotica. Infatti, è stato ampiamente documentato, che la comunicazione tra le due componenti è di fondamentale importanza durante i processi di accrescimento e maturazione (Li et al., 2013; Johnson et al., 2007). Bogliolo et al., (2007) hanno dimostrato che la vitrificazione del complesso cumulo-ovocita induce profonde alterazioni funzionali delle comunicazioni tra comparto somatico e quello germinale. Il danneggiamento delle fibre trans-zonali è stato anche evidenziato dopo vitrificazione dei complessi cumulo-ovocita di ratto, attraverso l'utilizzo della microscopia confocale a fluorescenza (Kim et al., 2014). Infine, è stato anche descritto che, in seguito a vitrificazione, le cellule del cumulo di ovino mostrano un ridotto grado di espansione dopo la maturazione in vitro, (Moawad et al. 2012; Moawad et al., 2013), suggerendo che le modificazioni non riguardano esclusivamente le componenti strutturali, ma possono comprometterne anche la funzionalità.

Numerosi studi hanno evidenziato che la tecnica di vitrificazione può provocare profonde alterazioni dell'organizzazione cromatinica e le componenti strutturali dell'ovocita. Il fuso meiotico e l'alterazione del regolare assetto cromatinico sono stati considerati fra le prime possibili cause di ridotte competenze allo sviluppo dell'ovocita vitrificato.

Nel presente studio l'analisi della morfologia della cromatina degli ovociti maturati in vitro dopo vitrificazione ha messo in evidenza come, nell'ovocita dell'animale adulto, il sistema di equilibratura dinamico abbia preservato l'integrità della cromatina, che è risultata normalmente assemblata nella piastra equatoriale in una buona percentuale di ovociti. Tale effetto non è, tuttavia, stato riscontrato nell'ovocita dell'animale prepubere dove entrambi i sistemi di vitrificazione hanno causato aberrazioni nella configurazione cromatinica.

L'utilizzo di un'esposizione graduale ai crioprotettori, inoltre, è risultata una buona strategia per limitare i danni a carico del fuso meiotico, caratterizzato da microtubuli assemblati in

maniera irregolare e talvolta assenti, sia nell'ovocita dell'animale adulto che prepubere .

Alterazioni a carico dell'apparato meiotico, in seguito alla vitrificazione dell'ovocita immaturo, sono state osservate nell'uomo (Coticchio et al., 2005), nel bovino (Albarracin et al., 2005), nel maiale (Rojas et al., 2004) e nell'ovino (Bogliolo et al., 2007; Ebrahimi et al., 2010a; Moawad 2013a). Inoltre, il sistema di vitrificazione V1 si è dimostrato un'efficiente alternativa al sistema V2 per il mantenimento del network dei microfilamenti di actina nella cortex dell'ovocita. Tale effetto è stato riscontrato solo nell'ovocita adulto. Infatti, nell'ovocita di prepubere, al contrario, la vitrificazione con il metodo V2 ha meglio preservato l'organizzazione dei microfilamenti. L'alterazione dei microfilamenti actinici indotti dalla vitrificazione dell'ovocita immaturo sono state osservate precedentemente nell'ovocita ovino (Fernandez-Reyez et al., 2012), nel bovino (Albarracin et al., 2005), nel maiale (Wu et al., 2006, Rojas et al., 2004), nel ratto (Kim et al., 2013

E' stato riportato che le alterazioni dei microfilamenti di actina corticale possono essere associati con ridotta competenza meiotica dell'ovocita e con l'insorgenza di alterazioni del fuso meiotico e aberrazioni cromosomiche (Somfai et al., 2011).

L'actina ovocitaria è essenziale per la maturazione e l'assemblamento del fuso meiotico (Li et al., 2013), per la determinazione della polarità dell'ovocita (Longo e Chen, 1986), per l'estrusione dei globuli polari e per la generazione di flussi intra-citoplasmatici che contribuiscono a stabilizzare il fuso meiotico in posizione periferica (Yi et al., 2012). Sebbene i dettagliati meccanismi con cui l'actina corticale intervenga nel posizionamento del fuso meiotico sia ancora oggetto di dibattito, numerosi studi hanno dimostrato che l'interazione tra le due componenti è mediata dai nucleatori actinici Formin-2 (FMN2) e Arp 2/3 (Shuh et al., 2008; Li et al., 2008; Yi et al., 2013; Azoury et al., 2008). Lenart et al., 2005, hanno, inoltre, proposto che i microfilamenti abbiano un ruolo anche nel convogliare i cromosomi dispersi nel citoplasma verso il fuso meiotico in via di formazione. La presenza di anomalie a carico

dell'actina corticale, indotte dalla vitrificazione a valle del processo di maturazione, perciò, potrebbe essere alla base della riduzione della competenza meiotica e alla comparsa delle anomalie del fuso osservate in questa sezione sperimentale.

Il processo di crioconservazione può, altresì, indurre alterazioni delle componenti molecolari dell'ovocita (Liu et al., 2003; Lee et al., 2008; Succu et al., 2008; Isachenko et al., 2009; Anchamparathy et al., 2010; Habibi et al., 2010; Turathum et al., 2010; Chamayou et al., 2011). Allo scopo di valutare l'influenza della crioconservazione a livello molecolare sul pattern di RNA messaggeri presenti nell'ovocita, è stata effettuata un'analisi quantitativa dell'espressione di un pannello di geni coinvolti in vari aspetti della biologia dell'ovocita, come il ciclo cellulare (cyclina B, P34), l'organizzazione del citoscheletro (Actb, Hook1, Kif11), la risposta allo stress (Cirpb, Hsp90b, Sod1) e l'apoptosi (Bax).

La proteina Sod1, o superossido dismutasi è un enzima chiave nella difesa anti-ossidante cellulare. Essa catalizza la conversione dell'anione superossido nel meno reattivo composto perossido di idrogeno, il quale, successivamente viene neutralizzato attraverso la conversione ad H₂O operata dall'enzima catalasi. E' stato dimostrato che, un'abbondante presenza di Sod1 nell'ovocita maturo è positivamente correlato con la competenza allo sviluppo dell'ovocita, in quanto riveste un ruolo chiave per la difesa antiossidante durante le prime fasi dello sviluppo dell'embrione (El Mouatassim et al., 1999). Kif11 e Hook1 sono geni coinvolti nell'assemblamento e mantenimento del fuso meiotico. Alterazioni dell'espressione del gene Kif11 possono essere correlate con l'arresto del ciclo cellulare, formazione di fusi monopolari, errori nella segregazione dei cromosomi e incremento dell'instabilità genomica (Blangy et al., 1995; Castillo et al., 2007b). La funzione del gene Hook1 è necessaria per il corretto posizionamento delle strutture microtubulari nelle cellule aploidi e alterazioni nell'espressione di tale gene possono essere associate ad alterazioni del funzionamento del macchinario mitotico/meiotico cellulare e incremento delle aberrazioni cromosomiche

(Hamatani et al., 2004). Il gene Hsp90b è coinvolto nella risposta allo shock termico. La proteina Hsp90b ha funzioni di chaperon molecolare e media il trasporto delle proteine che hanno subito danneggiamenti in seguito shock termici, verso gli organelli bersaglio deputati alla loro riparazione o degradazione (Vabulas et al., 2010). Cirbp (Cold-inducible RNA binding protein) appartiene alla famiglia delle proteine coinvolte nella risposta allo stress indotto dal freddo e ha una funzione di chaperon, che legando l'RNA messaggero, facilita la sua traduzione (Nishiyama et al., 1997). Il gene Cirbp è costitutivamente espresso a bassi livelli in vari tessuti ma viene up-regolato durante l'ipotermia (Xue et al., 1999), l'ipossia (Sheikh et al., 1997) e l'esposizione ad UV (Wellmann et al., 2004). La proteina anti-apoptotica Bax appartiene alla famiglia delle Bcl-2, le quali, regolando la permeabilità della membrana mitocondriale, sono responsabili della regolazione dell'apoptosi (Chao et al., 1998). P34 e ciclina B codificano per le due proteine che formano il complesso dell'MPF. La P34 riveste un ruolo essenziale nella regolazione del ciclo cellulare e ripresa della meiosi nell'ovocita immaturo, regolando la transizione tra le fasi G2/M del ciclo cellulare (Gautier et al., 1990; Roy et al., 1990).

I risultati ottenuti nella presente sperimentazione hanno mostrato, in generale, ridotte alterazioni dei pattern di espressione genica indotta dal processo di vitrificazione. Le uniche significative variazioni registrate riguardano il quantitativo dei geni Actb e Kiff dell'ovocita adulto, che potrebbero essere relazionabili con le alterazioni e i danneggiamenti provocati dalla vitrificazione sulle componenti citoscheletriche dell'ovocita. Analoghe alterazioni dell'espressione di Kiff11 sono state osservate anche in seguito alla vitrificazione del complesso cumulo ovocita murino, dove la vitrificazione ha aumentato i livelli di RNA messaggeri relativi a questo gene (Jo et al., 2012).

L'esposizione graduale a concentrazioni crescenti di crioprotettori (sistema V1) si è mostrata, nel complesso, il sistema di vitrificazione più efficiente anche per la crioconservazione

dell'ovocita maturato in vitro, soprattutto nell'ovocita dell'animale adulto.

Come si evince dai risultati dell'esperimento 2 tale sistema ha ridotto la degenerazione cellulare dopo il ripristino della temperatura, sia nell'ovocita adulto che nel prepubere, ottenendo percentuali di sopravvivenza tendenzialmente migliori di quelle riportate da altri autori, dopo vitrificazione con sistemi two steps (Succu et al., 2007ab; Berlinguer et al., 2007; Zhang et al., 2009; Hosseini et al., 2012). Utilizzando una strategia di esposizione ai crioprotettori simile a quella proposta in questa sperimentazione Asgari et al., (2011), hanno ottenuto risultati sovrapponibili ai nostri in termini di sopravvivenza. Le ricerche sull'ovocita ovino hanno frequentemente sollevato la problematica relativa al significativo aumento dell'attivazione partenogenetica spontanea dell'ovocita vitrificato in metafase seconda (Succu et al., 2007a; Succu et al., 2007b; Tian et al., 2007; Asgari et al., 2011; Succu et al., 2011). Tale fenomeno non ha avuto una rilevanza significativa nella presente sperimentazione, in quanto in entrambi i sistemi di vitrificazione, le percentuali di ovociti attivati partenogeneticamente sono risultate sovrapponibili agli ovociti controllo. Il determinismo di tale fenomeno potrebbe dipendere da differenti fattori, quali diverse concentrazioni di crioprotettori, utilizzo di differenti devices e composizione chimica delle soluzioni di vitrificazione (Succu et al., 2007a, 2007b). E' stato dimostrato che i fenomeni di attivazione partenogenetica spontanea sono correlati a un decremento dell'attività dell'MPF, correlato con l'ingresso di calcio mediato dall'utilizzo di crioprotettori, quali DMSO ed EG (Tian et al., 2007). Alterazioni dell'omeostasi del calcio, combinata con stimoli chimici indotti alla vitrificazione possono, dunque, innescare la transizione metafase II/anafaseII e la formazione di un pronucleo (Swann et al., 1994). E' stato suggerito che un periodo di coltura dell'ovocita in seguito al ripristino della temperatura, può consentire, almeno nell'animale adulto, il ripristino di livelli adeguati di MPF (Succu et al., 2007a; Succu et al., 2007b) per mantenere l'arresto meiotico. Inoltre, l'utilizzo di sostanze che stabilizzano il complesso dell'MPF, come

la caffeina (Ariu et al., 2014), e la rimozione di ioni calcio dal medium di vitrificazione (Succu et al., 2011), possono considerarsi utili strategie per limitare l'attivazione partenogenetica spontanea dell'ovocita.

E' ormai ben assodato che il fuso meiotico dell'ovocita maturo è altamente sensibile alle procedure di crioconservazione. La depolimerizzazione dei microtubuli può essere provocata dai trattamenti ipotermici (Magistrini e Szollosi, 1980; Van der Elst et al., 1988). Difetti nella polimerizzazione dei microtubuli sono stati attribuiti, altresì, alla tossicità dei crioprotettori comunemente impiegati, quali DMSO, EG, PrOH (Fahy, 1986), nonché alla concentrazione utilizzata (Joly et al., 1992; Van der Elst et al., 1992). In particolare, è stato dimostrato che l'utilizzo di crioprotettori penetranti come DMSO ed EG possono indurre la depolimerizzazione della tubulina dei microtubuli, che si traduce nell'aumento di aberrazioni cromosomiche (Larman et al., 2007; Gomes et al., 2008; Boiso et al., 2002; Kola et al., 1988). Le alterazioni del fuso meiotico indotte dalla crioconservazione sono state ampiamente documentate in molte specie (Almasi Turk et al., 2013; Coticchio et al., 2009; Jimenez-Trigos et al., 2011; Caamaño et al., 2013; Galeati et al., 2011; Asgari et al., 2011). In particolare nella specie ovina, la vitrificazione dell'ovocita, maturato in vitro, ha provocato profonde alterazioni del fuso meiotico (Succu et al., 2007a, 2007b; Asgari et al., 2011, 2012; Hosseini et al., 2012). L'impiego di molecole stabilizzatrici del citoscheletro, quali citocalasina B e tassolo, può contribuire a ridurre le alterazioni del fuso meiotico durante la crioconservazione, migliorando il successo della procedura in termini di sviluppo embrionale (Fujihira et al., 2004; Zhang et al., 2009; Rho et al., 2002; Fujihira et al., 2004; Ogawa et al., 2010; Yan et al., 2010), anche se, i risultati sono talvolta contrastanti (Marco-Jimenez et al., 2012; Silvestre et al., 2006; Jimenez-Trigos et al., 2013).

Nella presente sperimentazione, l'utilizzo del sistema V1 non ha provocato significative alterazioni del fuso meiotico, permettendo di ottenere risultati maggiori rispetto al sistema V2

utilizzato in questo studio e in altri lavori condotti nella specie ovina (Succu et al., 2007a; Asgari et al., 2011; Succu et al., 2007a; Asgari et al., 2011; Hosseini et al., 2012). Tuttavia, l'efficacia mostrata nel preservare la struttura dell'apparato meiotico, non è stata confermata nell'ovocita di animale prepubere, dove sono state osservate disorganizzazioni della tubulina in entrambi i sistemi di vitrificazione. Numerosi studi indicano che il fenomeno di depolimerizzazione dei microtubuli può essere reversibile e, se l'ovocita viene coltivato in vitro per un periodo da 1 a 3 ore, esso può riuscire a ripristinare il danno (Rienzi et al., 2004; Succu et al., 2007b; Berlinguer et al., 2007). Nel presente studio, la coltura post warming degli ovociti di pecora, esposti ai graduali di CPA può aver consentito l'eventuale ripristino dei danneggiamenti, mentre lo stesso effetto non è stato osservato nel sistema V2, suggerendo che le modificazioni indotte da tale protocollo potrebbero essere di maggiore entità e non reversibili. Nel prepubere, al contrario, la coltura post-warming non ha consentito il ripristino delle alterazioni, probabilmente, a causa delle caratteristiche intrinseche tipiche degli ovociti di soggetti prepuberi. Numerosi studi hanno, infatti, evidenziato come il gamete femminile di animali che non hanno ancora raggiunto la maturità sessuale esibisca notevoli differenze nella composizione strutturale, molecolare e metabolica, (Ledda et al., 1999, 2001, 2007; O'Brien et al., 1996, 1997a; 1997b; Kochhar et al., 2002; Leoni et al., 2006, 2007; Ptak et al., 1999; Kelly et al., 2005), che contribuiscono a rendere questa categoria di ovociti maggiormente suscettibili a condizioni di stress.

Rispetto alla componente microtubulare del fuso meiotico, i microfilamenti di actina dell'ovocita sono stati meno investigati in relazione alle modificazioni indotte dalla crioconservazione. I risultati ottenuti hanno sottolineato come tali componenti citoscheletriche risultino più sensibili all'esposizione ai crioprotettori e al raffreddamento rispetto ai microtubuli. Infatti, sia negli ovociti di pecora adulta che prepubere, è stata osservata l'alterazione del normale assemblamento dei filamenti di actina nella cortex dell'ovocita.

Nonostante ciò, l'esposizione graduale a gradienti crescenti di crioprotettori ha ridotto la comparsa di forme diffuse e discontinue nell'organizzazione dell'actina corticale, permettendo di migliorare l'efficienza di preservazione di tale componente. Simili alterazioni sono state osservate in ovociti di altre specie (Saunders e Park, 1999; Kim et al., 2014; Basarab et al., 2008, Wu et al., 2006; Rojas et al., 2004), mentre la carenza di studi nella specie ovina rende di difficile interpretazione i dati. E' risaputo, tuttavia, che le alterazioni dell'actina ovocitaria concorrono notevolmente a ridurre il potenziale di sviluppo dell'ovocita. Nella metafase II, infatti, i microfilamenti rivestono un ruolo cruciale durante il processo di fecondazione, in quanto essi intervengono nella formazione del cono di fecondazione, nell'esocitosi dei granuli corticali per la difesa contro la polispermia e nel processo di migrazione dei pronuclei (Simerly et al., 1995; Schatten et al., 1987). Tuttavia, l'utilizzo di sostanze che depolimerizzano il network di actina, come la latrunculina A, possono migliorare le proprietà viscoelastiche del citoplasma, aumentando il successo della vitrificazione in termini di sopravvivenza e competenza allo sviluppo (Hosu et al., 2008).

Per valutare la presenza di alterazioni a livello molecolare, negli ovociti maturati in vitro è stata condotta l'analisi dell'espressione genica analogamente a quanto descritto per gli ovociti immaturi, che ha mostrato che la vitrificazione non ha, in generale, alterato gravemente il quantitativo di RNA messaggeri della maggior parte dei geni analizzati. Nella pecora adulta, la vitrificazione con il sistema a due step ha indotto modificazioni dell'espressione del gene Hook1, che potrebbero essere correlabili con l'incremento di anomalie del fuso osservate in questo gruppo. Alterazioni dell'espressione di questo gene è stata riscontrata anche in seguito a vitrificazione di ovociti di specie differenti (Habibi et al., 2010; Jo et al., 2012). Nel prepubere, sono state osservate alterazioni nell'espressione dei geni ActB e Cirbp, che potrebbero essere correlabili con le alterazioni indotte nei microfilamenti del citoscheletro e risposta indotta da shock termico. L'up-regolazione dell'espressione del gene Cirbp è stata

riportata anche in seguito alla vitrificazione dell'ovocita murino (Wen et al., 2014).

Il mantenimento di un efficiente status ossido-riduttivo è imperativo per la sopravvivenza e la biologia dell'ovocita crioconservato. La regolare attività mitocondriale dell'ovocita, infatti, svolge un ruolo cruciale per la competenza dell'ovocita di mammifero e per la sua capacità di sostenere lo sviluppo embrionale (Van Blerkom, 2011; Wang et al., 2009). Durante la maturazione nucleare e la fertilizzazione, gli spostamenti dei cromosomi e dei pronuclei è accompagnata da una coordinata riorganizzazione degli organuli citoplasmatici, in particolare dei mitocondri, che potrebbero essere coinvolti nella concentrazione di molecole di ATP e calcio, o nella regolazione del pH, in determinate regioni dell'ovocita, a sostegno di un normale sviluppo embrionale (Van Blerkom, 1996). Alterazioni dell'attività mitocondriale in seguito ad uno stress, può contribuire all'incremento dell'attività respiratoria e della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), inducendo alterazioni dello stato redox cellulare e ossidazione delle principali categorie di macromolecole biologiche, inclusi lipidi, proteine e acidi nucleici (Tiwari et al., 2002). In condizioni fisiologiche ottimali, i sistemi endogeni di difesa anti-ossidante sono in grado di detossificare la cellula dall'eccessiva quantità di ROS (Apel et al., 2004).

In seguito alla vitrificazione, negli ovociti di animale adulto, è stato osservato un incremento dell'attività mitocondriale, non accompagnato da un simultaneo incremento dei livelli di ROS, suggerendo che le modificazioni indotte nello stato redox cellulare dai sistemi di vitrificazione proposti in questa sperimentazione, possono essere ripristinate dalle difese antiossidanti endogene. Al contrario, nell'ovocita di prepubere, la globale carenza di enzimi e fattori della difesa anti-ossidante potrebbe essere alla base degli aumentati livelli di stress osservati, indipendentemente dalla metodologia di esposizione e dalla concentrazione di crioprotettori.

L'ultima parte della sperimentazione (esperimento 3) ha investigato le potenzialità della

Microspettroscopia Raman (RMS) per la visualizzazione dei cambiamenti che avvengono nel comparto proteico della regione corticale dell'ovocita, con particolare riferimento alla disorganizzazione dell'actina filamentosa.

Questo studio è stato ulteriormente motivato dai risultati ottenuti in precedenza dal nostro gruppo, in cui è stato dimostrato che la RMS è stata in grado di rilevare modificazioni indotte nella zona pellucida di ovociti di ovino in seguito a vitrificazione (Bogliolo et al., 2012) e in seguito all'instaurarsi di condizioni di stress ossidativo legato all'invecchiamento (Bogliolo et al., 2013). La potenzialità di questa tecnica per l'analisi dell'ovocita è stata evidenziata dallo studio pilota di Wood et al., (2008), in cui la RMS è stata utilizzata per l'analisi dell'architettura molecolare dell'ovocita immaturo e maturo di topo e dallo studio di Davidson et al., (2012), in cui la tecnica è stata utilizzata per lo studio della redistribuzione delle componenti molecolari durante la maturazione dell'ovocita e lo sviluppo embrionale. Inoltre, gli aspetti che sono stati investigati finora sono ampiamente variegati, includendo lo studio della composizione molecolare di cellule e tessuti (Zhang et al., 2009; Jurasekova et al., 2011; Ermakov et al., 2005; Rusciano et al., 2009), della differenziazione e trasformazione cellulare (Shulze et al., 2010; Pascut et al., 2011; Jess et al., 2007; Brozek-Pluska et al., 2011) e delle modificazioni indotte da stress ossidativo (Krafft et al., 2006; Zachariah et al., 2010; Jurasekova et al., 2011).

I risultati del presente lavoro aggiungono un nuovo elemento alla varietà delle applicazioni della RMS, poiché essi dimostrano che questa tecnica è in grado di discriminare tra ovociti con network di F-actina normale e anormale. E' importante sottolineare che i dati, ottenuti dagli spettri Raman in seguito alle scansioni puntiformi della regione corticale dell'ovocita, sono riferibili all'intero contenuto di proteine e alle modificazioni che avvengono nel set proteico del cortex. Tuttavia, considerando che la F-actina è il maggior costituente del contenuto proteico totale della regione corticale e considerati i risultati ottenuti in seguito alla

depolimerizzazione del network tramite la latrunculina-A, possiamo ipotizzare che le informazioni ottenute dagli spettri Raman possano essere riferibili principalmente alle modificazioni della F-actina. Inoltre, la buona corrispondenza tra le immagini Raman e quelle ottenute attraverso microscopia confocale a fluorescenza potrebbe supportare questa conclusione. Un simile confronto tra le immagini Raman e immagini ottenute con classica immunofluorescenza è stato riportato per lo studio delle sinapsi (Zoladek et al., 2010) e dei mitocondri (Matthäus et al., 2007).

Gli effetti della crioconservazione sull'organizzazione dell'actina ovocitaria sono stati osservati prevalentemente utilizzando la marcatura fluorescente a base di falloidina, che si lega specificatamente alla F-actina. Questa colorazione presenta lo svantaggio di dover essere applicata a cellule fissate, in quanto, se utilizzata in cellule vitali, può creare artefatti (Cooper, 1987). La RMS potrebbe rappresentare un metodo addizionale per lo studio dell'actina senza l'utilizzo di marcature. Nel nostro studio, siamo ricorsi alla fissazione del campione prevalentemente per esigenze tecniche, in quanto, per ottenere l'imaging di una regione molto ampia dell'ovocita, le misurazioni hanno richiesto circa 5 ore. Di certo, per l'applicazione della RMS nell'analisi in cellule vive è imperativa la riduzione dei tempi di acquisizione. La scansione puntiforme e le scansioni lineari potrebbero accorciare sensibilmente il tempo di acquisizione e fornire al tempo stesso un'impronta biochimico-molecolare rappresentativa dello status dell'ovocita e delle sue componenti. Inoltre, un eventuale utilizzo della spettroscopia Raman risonante, come la spettroscopia CARS (coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy), potrebbe accelerare ulteriormente l'acquisizione dei dati (Downes et al., 2011).

8 - CONCLUSIONI

Le attuali strategie mirate al miglioramento dell'efficienza della vitrificazione dell'ovocita prevedono lo sviluppo di protocolli atti ad ottimizzare le fasi di esposizione ai crioprotettori, raffreddamento e ripristino della temperatura in modo da limitare la tossicità dei crioprotettori e gli insulti osmotici e termici. In linea con tali strategie, nel presente studio è stata testata la potenzialità di un protocollo di vitrificazione progettato in modo da creare una dinamica e graduale esposizione degli ovociti di ovino adulto e prepubere a gradienti di concentrazioni crescenti di crioprotettori (sistema V1). L'effetto di tale sistema è stato valutato comparativamente ad un protocollo di vitrificazione two steps che prevedeva l'impiego dei crioprotettori a concentrazioni più alte (sistema V2). Le indagini sono state indirizzate alla valutazione degli effetti dei due sistemi di vitrificazione, in relazione allo stadio meiotico dell'ovocita (GV ed MII), sulla sopravvivenza, le modificazioni strutturali e molecolari e lo stress ossidativo.

Nel complesso, i risultati ottenuti hanno dimostrato come il sistema V1 permetta di migliorare l'efficienza della vitrificazione dell'ovocita ovino, rispetto al classico metodo two-steps. Tale sistema ha contribuito alla riduzione delle alterazioni correlabili agli stress osmotici, incrementando la performance della crioconservazione.

La validità del protocollo di vitrificazione V1 è risultata particolarmente evidente nell'ovocita maturo di animale adulto, come dimostrato dalle percentuali di sopravvivenza, le analisi strutturali e molecolari, la valutazione dei livelli di ROS e dell'attività mitocondriale. L'effetto positivo di tale sistema è stato particolarmente evidente nel preservare l'integrità dei microtubuli del fuso e la configurazione della cromatina, permettendo la conservazione della morfologia di queste componenti a livelli comparabili con l'ovocita non vitrificato.

L'efficienza mostrata nell'ovocita della pecora adulta, non è stata analogamente riscontrata nell'animale prepubere. Infatti, i risultati ottenuti denotano un'elevata suscettibilità di questi

ovociti alla tossicità dei crioprotettori e al raffreddamento, verosimilmente ascrivibile alle differenti caratteristiche strutturali e molecolari dell'ovocita dell'animale prepubere. In particolare, in questa categoria di ovociti, l'impiego del sistema V1 ha migliorato la sopravvivenza degli ovociti e la morfologia dell'actina corticale comparativamente al sistema V2, mentre, indipendentemente dalla metodica utilizzata, sono state osservate anomalie del fuso e aumenti nei livelli di ROS intracellulari e dell'attività mitocondriale.

Tuttavia, i risultati della presente sperimentazione sottolineano come, sia nell'adulto che nel prepubere, l'impiego di ovociti allo stadio di metafase II sembra ancora preferibile a quello di vescicola germinale, come dimostrato dalle elevate percentuali di degenerazione e la ridotta competenza meiotica degli ovociti vitrificati allo stadio di vescicola germinale.

Un ulteriore approccio proposto nella presente sperimentazione ha riguardato lo sviluppo di metodiche non invasive per la valutazione delle componenti molecolari dell'ovocita, quali la microspettroscopia Raman (RMS). Tale tecnica si è dimostrata un valido strumento per l'analisi label-free delle modificazioni della regione subcorticale dell'ovocita con particolare riferimento alle modificazioni dell'F-actina, in quanto ha permesso di rilevare efficacemente le differenze tra ovociti con alterati network di actina corticale in seguito a trattamento con i crioprotettori e vitrificazione.

In conclusione, i risultati della sperimentazione offrono nuove e interessanti premesse per il miglioramento dei protocolli di vitrificazione dell'ovocita ovino e delle tecniche di analisi non invasiva dell'ovocita. Tali sistemi richiedono sicuramente un'ulteriore implementazione, che preveda l'impiego di sostanze che proteggano le componenti citoscheletriche, molecole che stabilizzino le componenti molecolari dell'ovocita e, non meno importanti, agenti ad azione antiossidante. Inoltre, lo sviluppo di sistemi in microfluidica che permettano l'esposizione automatizzata ai crioprotettori, permetteranno, nel prossimo futuro, di ottimizzare l'applicazione in campo clinico di tale metodologia.

Per ultimo la validazione della bontà del sistema di vitrificazione proposto necessita di ulteriori indagini mirate alla valutazione della competenza allo sviluppo embrionale dell'ovocita vitrificato dopo fertilizzazione in vitro, coltura embrionale e trasferimento in animali riceventi.

Sebbene la RMS si candidi come promettente tecnica di analisi per un eventuale utilizzo routinario nella valutazione della qualità dell'ovocita, sono necessari ulteriori studi per confermare l'affidabilità e la sicurezza della tecnica e per ottenere maggiori validazioni per migliorare l'interpretazione dei dati. Inoltre, l'approfondita analisi condotta in questo studio sull'actina corticale in microscopia confocale a fluorescenza, negli esperimenti 1 e 2, e tramite RMS, nell'esperimento 3, ha contribuito ad arricchire le scarse conoscenze disponibili nella specie ovina circa gli effetti della crioconservazione su questa componente citoscheletrica.

9 - BIBLIOGRAFIA

- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev.* 2002 Jan;61(1):57-66.
- Ajduk A, Ilozue T, Windsor S, Yu Y, Seres KB, Bomphrey RJ, Tom BD, Swann K, Thomas A, Graham C, Zernicka-Goetz M. Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability. *Nat Commun.* 2011 Aug 9;2:417
- Albarracin et al., 2005, Vitrification of Calf Oocytes: Effects of Maturation Stage and Prematuration Treatment on the Nuclear and Cytoskeletal Components of Oocytes and Their Subsequent Development
- Almasi Turk S, Roozbehi A. Mouse Oocytes and Embryos Cryotop-vitrification Using Low Concentrated Solutions: Effects on Meiotic Spindle, Genetic Material Array and Developmental Ability. *Iran J Basic Med Sci.* 2013 Apr;16(4):599-609
- Anchamparuthy VM, Pearson RE, Gwazdauskas FC. Expression pattern of apoptotic genes in vitrified-thawed bovine oocytes. *Reprod Domest Anim* 2010;45:e83-e90
- Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004;55:373–399
- Arav A, Zeron Y, Leslie SB, Behboodi E, Anderson GB, Crowe JH. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology.* 1996 Dec;33(6):589-99.
- Asgari V, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Azhdari ZT, Mosaie M, Nasr-Esfahani MH. Specific activation requirements of in vitro-matured sheep oocytes following vitrification-warming. *Mol Reprod Dev.* 2012 Jul;79(7):434-44.
- Asgari V, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Nasr-Esfahani MH. Time dependent effect of post warming interval on microtubule organization, meiotic status, and parthenogenetic activation of vitrified in vitro matured sheep oocytes. *Theriogenology.* 2011 Mar 15;75(5):904-10.
- Azoury J, Lee KW, Georget V, Hikal P, Verlhac MH. Symmetry breaking in mouse oocytes requires transient F-actin meshwork destabilization. *Development.* 2011;138:2903–8.
- Azoury, J. et al. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Cur. Biol.* 18, 1514–1519 (2008).
- Azoury, J. et al. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Cur. Biol.* 18, 1514–1519 (2008).
- Barcelo-Fimbres M & Seidel GE Jr 2007 Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 74 1406–1418

- Becker KA, Hart NH. Reorganization of filamentous actin and myosin-II in zebrafish eggs correlates temporally and spatially with cortical granule exocytosis. *J Cell Sci.* 1999 Jan;112 (Pt 1):97-110.
- Berlinguer F, Succu S, Mossa F, Madeddu M, Bebbere D, Leoni GG, Naitana S. Effects of trehalose co-incubation on in vitro matured prepubertal ovine oocyte vitrification. *Cryobiology.* 2007 Aug;55(1):27-34.
- Bhat MH, Sharma V, Khan FA, Naykoo NA, Yaqoob SH, Ruby, Khan HM, Fazili MR, Ganai NA, Shah RA. Comparison of slow freezing and vitrification on ovine immature oocytes. *Cryo Letters.* 2014 Jan-Feb;35(1):77-82.
- Bielanski A. Biosafety in embryos and semen cryopreservation, storage, management and transport. *Adv Exp Med Biol.* 2014;753:429-65
- Blangy A, Lane HA, d'Hérin P, Harper M, Kress M, Nigg EA. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell.* 1995 Dec 29;83(7):1159-69.
- 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 Nov;68(8):1138-49.
- Bogliolo L, Ledda S, Innocenzi P, Ariu F, Bebbere D, Rosati I, Leoni GG, Piccinini M. Raman microspectroscopy as a non-invasive tool to assess the vitrification-induced changes of ovine oocyte zona pellucida. *Cryobiology* 2012;64:267-272.
- Bogliolo L, Murrone O, Di Emidio G, Piccinini M, Ariu F, Ledda S, Tatone C. Raman spectroscopy-based approach to detect aging-related oxidative damage in the mouse oocyte. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:877-82.
- Boiso, I., Marti, M., Santalo, J., Ponsa, M., Barri, P.N., Veiga, A., 2002. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum. Reprod.* 17, 1885–1891
- Bromfield JJ, Coticchio G, Hutt K, Sciajno R, Borini A, Albertini DF. Meiotic spindle dynamics in human oocytes following slow-cooling cryopreservation. *Hum Reprod.* 2009 Sep;24(9):2114-23
- Caamaño JN, Díez C, Trigal B, Muñoz M, Morató R, Martín D, Carrocera S, Mogas T, Gómez E. Assessment of meiotic spindle configuration and post-warming bovine oocyte viability using polarized light microscopy. *Reprod Domest Anim.* 2013 Jun;48(3):470-6
- Camus A, Clairaz P, Ersham A, Van Kappel AL, Savic G & Staub C 2006 Principe de la vitrification: cine'tiques comparatives. The comparison of the process of five different vitrification devices. *Gyne'cologie, Obste'trique & Fertilité'* 34 737–745.
- Camus A, Clairaz P, Ersham A, Van Kappel AL, Savic G & Staub C 2006 Principe de la vitrification: cine'tiques comparatives. The comparison of the process of five different

vitrification devices. *Gyne'cologie, Obste'trique & Fertilit'e'* 34 737–745.

Castillo A, Justice MJ. The kinesin related motor protein, Eg5, is essential for maintenance of pre-implantation embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007a Jun 8;357(3):694-9.

Castillo A, Morse HC 3rd, Godfrey VL, Naeem R, Justice MJ. Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. *Cancer Res.* 2007b Nov 1;67(21):10138-47.

Chamayou S, Bonaventura G, Alecci C, Tibullo D, Di Raimondo F, Guglielmino A, Barcellona ML. Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. *Cryobiology* 2011;62:130 – 134.

Chen C. (1986) "Pregnancy after human oocyte cryopreservation". *Lancet* **1** (8486): 884-886.

Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN & Yang YS 2001 Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reproduction* 16 2350–2356

Cheng Z, Ristow M. 2013. Mitochondria and metabolic homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 19:240-242.

Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Buckett WM & Tan SL 2005 High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertility and Sterility* 84 S36

Clark NA, Swain JE. Oocyte cryopreservation: searching for novel improvement strategies. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Jul;30(7):865-75.

Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril.* 2011 Aug;96(2):277-85.

Cobo A, Pérez S, De los Santos MJ, Zulategui J, Domingo J, Remohí J. Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2008 Sep;17(3):350-9.

Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326: 1–16

Comizzoli P, Holt WV. Recent advances and prospects in germplasm preservation of rare and endangered species. *Adv Exp Med Biol.* 2014;753:331-56

Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biology.* 1987; 105: 1473-1478.

Coticchio et al., 2005 Criteria to assess human oocyte quality after cryopreservation

Coticchio G, Bromfield JJ, Sciajno R, Gambardella A, Scaravelli G, Borini A, Albertini DF. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2009

- Curry MR. Cryopreservation of mammalian semen. *Methods Mol Biol.* 2007;368:303-11.
- Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:67–101
- Davidson B, Murray AA, Elfick A, Spears N. Raman micro-spectroscopy can be used to investigate the developmental stage of the mouse oocyte. *PLoS One* 2013; 8:e67972.
- Davidson B, Spears N, Murray A, Elfick A. The changing biochemical composition and organisation of the murine oocyte and early embryo as revealed by Raman spectroscopic mapping. *J Raman Spectrosc.* 2012;43:24-31.
- Deng M, Kishikawa H, Yanagimachi R, Kopf GS, Schultz RM, Williams CJ. Chromatin-mediated cortical granule redistribution is responsible for the formation of the cortical granule-free domain in mouse eggs. *Dev Biol.* 2003 May 1;257(1):166-76.
- Deng M, Li R. Sperm chromatin-induced ectopic polar body extrusion in mouse eggs after ICSI and delayed egg activation. *PLoS One.* 2009 Sep 29;4(9)
- Dessolle L, de Larouzière V, Ravel C, Berthaut I, Antoine JM, Mandelbaum J., Slow freezing and vitrification of human mature and immature oocytes,. *Gynecol Obstet Fertil.* 2009 Sep;37(9):712-9.
- Donnez J, Silber S, Andersen CY, Demeestere I, Piver P, Meirow D, Pellicer A, Dolmans MM. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births. *Ann Med.* 2011;43:437–50
- Downes A, Mouras R, Bagnaninchi P, Elfick A. Raman spectroscopy and CARS microscopy of stem cells and their derivatives. *J Raman Spectrosc.* 2011; 42: 1864–1870.
- Dumollard R, Ward Z, Carrol J, Duchen MR. Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development* 2007;134:455–465.
- Dursun P, Doğan NU, Ayhan A. Oncofertility for gynecologic and non-gynecologic cancers: Fertility sparing in young women of reproductive age. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014 Jul 22
- Ebrahimi B, Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Baharvand H. In vitro maturation, apoptotic gene expression and incidence of numerical chromosomal abnormalities following cryotop vitrification of sheep cumulus-oocyte complexes. *J Assist Reprod Genet.* 2010a May;27(5):239-46.
- Ebrahimi B, Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Baharvand H, Farrokhi A. IVM and gene expression of sheep cumulus-oocyte complexes following different methods of vitrification. *Reprod Biomed Online.* 2010b Jan;20(1):26-34.
- El Mouatassim S, Guérin P, Ménézo Y. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Mol Hum Reprod.* 1999 Aug;5(8):720-5
- Fahy GM. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology.* 1986

Feb;23(1):1-13.

Farsi MM, Kamali N, Pourghasem M. Embryological aspects of oocyte in vitro maturation. *Int J Mol Cell Med*. 2013 Summer;2(3):99-109.

Fernández-Reyez F, Ducolomb Y, Romo S, Casas E, Salazar Z, Betancourt M. Viability, maturation and embryo development in vitro of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology*. 2012 Jun;64(3):261-6.

Fujihira T, Kishida R, Fukui Y. Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI: effects of cytochalasin B and cryoprotectants. *Cryobiology*. 2004 Dec;49(3):286-90.

Galeati G, Spinaci M, Vallorani C, Bucci D, Porcu E, Tamanini C. Pig oocyte vitrification by cryotop method: effects on viability, spindle and chromosome configuration and in vitro fertilization. *Anim Reprod Sci*. 2011 Aug;127(1-2):43-9.

Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Maller JL. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell*. 1990 Feb 9;60(3):487-94

Genicot G, Leroy JL, Soom AV, Donnay I. 2005. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology* 63:1183–1194.

Giaretta E, Spinaci M, Bucci D, Tamanini C, Galeati G. Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:920257.

Glujovsky D, Riestra B, Sueldo C, Fiszbajn G, Repping S, Nodar F, Papier S, Ciapponi A. Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Sep 5;9:CD010047.

Gomes CM, Silva CA, Acevedo N, et al. Influence of vitrification on mouse metaphase II oocyte spindle dynamics and chromatin alignment. *Fertil Steril*. 2008;90:1396–404.

Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R. Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. *Fertility and Sterility* 2009; 91: 1023-1034

Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010 May 15;93(8):2602-7

Habibi A, Farrokhi N, Moreira da Silva F, Bettencourt BF, Bruges-Armas J, Amidi F, Hosseini A. The effects of vitrification on gene expression in mature mouse oocytes by nested quantitative PCR. *J Assist Reprod Genet*. 2010 Nov;27(11):599-604.

Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet*. 2004 Oct 1;13(19):2263-78.

Heo YS, Lee HJ, Hassell BA, Irimia D, Toth TL, Elmoazzen H, Toner M. Controlled loading

of cryoprotectants (CPAs) to oocyte with linear and complex CPA profiles on a microfluidic platform. *Lab Chip*. 2011 Oct 21;11(20):3530-7.

Hosseini SM, Asgari V, Ostadhosseini S, Hajian M, Piryaei A, Najarasl M, Nasr-Esfahani MH. Potential applications of sheep oocytes as affected by vitrification and in vitro aging. *Theriogenology*. 2012 Jun;77(9):1741-53.

Hosu BG, Mullen SF, Critser JK, Forgacs G. Reversible disassembly of the actin cytoskeleton improves the survival rate and developmental competence of cryopreserved mouse oocytes. *PLoS One*. 2008 Jul 30;3(7):e2787

Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G & Folch J 2001 The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo Letters* 22 157–162

Isachenko V, Isachenko E, Michenlmann HW, Alabart JL, Vazquez I, Bezugly N, Nawroth F. 2001a. Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV oocytes. *Anat Histol Embryol* 30:333–338.

Jain JK, Paulson RJ. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2006 Oct;86(4Suppl):1037-46.

Jiménez-Trigos E, Naturil-Alfonso C, Vicente JS, Marco-Jiménez F. Post-warming competence of in vivo matured rabbit oocytes treated with cytoskeletal stabilization (Taxol) and cytoskeletal relaxant (Cytochalasin B) before vitrification. *Reprod Domest Anim*. 2013 Feb;48(1):15-9.

Jiménez-Trigos E, Naturil-Alfonso C, Vicente JS, Marco-Jiménez F. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle, cortical granule distribution and development of rabbit oocytes. *Reprod Domest Anim*. 2012 Jun;47(3):472-8.

Jo JW, Jee BC, Lee JR, Suh CS. Effect of antifreeze protein supplementation in vitrification medium on mouse oocyte developmental competence. *Fertil Steril*. 2011 Nov;96(5):1239-45.

Jo JW, Jee BC, Suh CS, Kim SH. The beneficial effects of antifreeze proteins in the vitrification of immature mouse oocytes. *PLoS One*. 2012;7(5):e37043.

Joly C, Bchini O, Boulekbache H, Testart J, Maro B. Effects of 1,2-propanediol on the cytoskeletal organization of the mouse oocyte. *Hum Reprod*. 1992 Mar;7(3):374-8.

Jones A, Van Blerkom J, Davis P, Toledo AA. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. *Hum Reprod* 2004;19:1861–1866.

Katz-Jaffe MG, Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Exposure of mouse oocytes to 1,2-propanediol during slow freezing alters the proteome. *Fertil Steril* 2008;89:1441– 1447

Kelly JM, Kleemann DO, Walker SK. Enhanced efficiency in the production of offspring from 4- to 8-week-old lambs. *Theriogenology*. 2005 Apr 15;63(7):1876-90

Kim SS, Olsen R, Kim DD, Albertini DF. The impact of vitrification on immature oocyte cell

- cycle and cytoskeletal integrity in a rat model. *J Assist Reprod Genet.* 2014 Jun;31(6):739-47.
- Kline, D., Kline, J.T., 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.* 149, 80–89
- Kochhar HP, Wu B, Morris LH, Buckrell BC, Pollard JW, Basrur PK, King WA. Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reprod Domest Anim.* 2002 Feb;37(1):19-25.
- Koeman J, Keefer CL, Baldassarre H, Downey BR. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology.* 2003 Sep 15;60(5):879-89.
- Kola, I., Kirby, C., Shaw, J., Davey, A., Trounson, A., 1988. Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. *Teratology* 38, 467–474.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999; 14:3077-9
- Kuleshova LL., Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002; 78: 449-54.
- Kuwayama M & Kato O 2000 All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 17:477 (abstract)
- Kuwayama M, Fujikawa S, Nagai T. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. *Cryobiology.* 1994 Oct;31(5):415-22.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S & Kato O 2005 Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive Biomedicine Online* 11 608–614
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 2005; 11:300–308.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril.* 1999 Dec;72(6):1073-8
- Larman MG, Minasi MG, Rienzi L, Gardner DK. Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2007;15:692–700
- Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction.* 2006 Jan;131(1):53-61.
- Lawrence, Y., Whitaker, M., Swann, K., 1997. Sperm–egg fusion is the prelude to the initial Ca²⁺ increase at fertilization in the mouse. *Development* 124, 233–241.
- Ledda S, Bogliolo L, Calvia P, Leoni G, Naitana S. Meiotic progression and developmental

- competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *J Reprod Fertil.* 1997 Jan;109(1):73-8.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S. Cell coupling and maturation-promoting factor activity in in vitro-matured prepubertal and adult sheep oocytes. *Biol Reprod.* 2001 Jul;65(1):247-52.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S. Follicular size affects the meiotic competence of in vitro matured prepubertal and adult oocytes in sheep. *Reprod Nutr Dev.* 1999 Jul-Aug;39(4):503-8.
- Ledda S, Bogliolo L, Succu S, Ariu F, Bebbere D, Leoni GG, Naitana S. Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival. *Reprod Fertil Dev.* 2007;19(1):13-23.
- Lei T, Guo N, Liu JQ, Tan MH, Li YF. Vitrification of in vitro matured oocytes: effects on meiotic spindle configuration and mitochondrial function, *Int J Clin Exp Pathol* 2014a;7(3):1159-165
- Lei T, Guo N, Tan MH, Li YF. Effect of mouse oocyte vitrification on mitochondrial membrane potential and distribution. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2014b Feb;34(1):99-102.
- Lenart, P., Bacher, C.P., Daigle, N., Hand, A.R., Eils, R., Terasaki, M., and Ellenberg, J. (2005). A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature* 436, 812–818
- Leoni GG, Bebbere D, Succu S, Berlinguer F, Mossa F, Galioto M, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S. Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2007 Feb;74(2):249-57
- Leoni GG, Succu S, Berlinguer F, Rosati I, Bebbere D, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S. Delay on the in vitro kinetic development of prepubertal ovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 2006 May;92(3-4):373-83
- Lewin B. Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners and substrates. *Cell* 1990; 61:743-752
- Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:141–52.
- Li, H., Guo, F., Rubinstein, B. & Li, R. Actin-driven chromosomal motility leads to symmetry breaking in mammalian meiotic oocytes. *Nature Cell Biol.* 10, 1301–1308 (2008).
- Longo FJ, Chen DY. Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol.* 1985 Feb;107(2):382-94.
- Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic

review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2008 Jul;90(1):186-93

Lovelock JE, The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem J* 1954;56:265-70.

Luyet B, The vitrification of organic colloids and protoplasm. *Biodynamica* 1937; 1:1-14

Magistrini M, Szöllösi D. Effects of cold and of isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. *Eur J Cell Biol*. 1980 Oct;22(2):699-707

Mailhes JB, Carabatsos MJ, Young D, London SN, Bell M, Albertini DF. Taxol-induced meiotic maturation delay, spindle defects, and aneuploidy in mouse oocytes and zygotes. *Mutat Res*. 1999 Jan 25;423(1-2):79-90.

Mara L, Casu S, Carta A, Dattena M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim Reprod Sci*. 2013 Feb 22

Marco-Jiménez F, Casares-Crespo L, Vicente JS. Effect of cytochalasin B pre-treatment of in vitro matured porcine oocytes before vitrification. *Cryo Letters*. 2012 Jan-Feb;33(1):24-30

Matthaus C, Bird B, Miljkovic M, Chemenko T, Romeo M, Diem M. Infrared and Raman microscopy in cell biology. *Methods Cell Biol*. 2008;89:275–308.

Matthäus C, Chernenko T, Newmark JA, Warner CM, Diem M. Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy. *Biophys J*. 2007;93:668-73.

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

Mazur P. Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. *Orif Life*, 1980;10:137-59

McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil*. 2000 Jan;118(1):163-70.

Men H, Agca Y, Riley L, Critser JK (2006) Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology* 66:2008–2016

Miller RH, Mazur P. Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. *Cryobiology*. 1976 Aug;13(4):404-14.

Moawad AR, Fisher P, Zhu J, Choi I, Polgar Z, Dinnyes A, Campbell KH. In vitro fertilization of ovine oocytes vitrified by solid surface vitrification at germinal vesicle stage. *Cryobiology*. 2012 Oct;65(2):139-44.

Moawad AR, Zhu J, Choi I, Amarnath D, Campbell KH. Effect of Cytochalasin B pretreatment on developmental potential of ovine oocytes vitrified at the germinal vesicle

stage. *Cryo Letters*. 2013b Nov-Dec;34(6):634-44.

Moawad AR, Zhu J, Choi I, Amarnath D, Chen W, Campbell KH. Production of good-quality blastocyst embryos following IVF of ovine oocytes vitrified at the germinal vesicle stage using a cryoloop. *Reprod Fertil Dev*. 2013b;25(8):1204-15.

Morató R, Izquierdo D, Albarracín JL, Anguita B, Palomo MJ, Jiménez-Macedo AR, Paramio T, Mogas T. Effects of pre-treating in vitro-matured bovine oocytes with the cytoskeleton stabilizing agent taxol prior to vitrification. *Mol Reprod Dev*. 2008 Jan;75(1):191-201

Mujahid A, Pumford NR, Bottje W, Nakagawa K, Miyazawa T, Akiba M, et al. Mitochondrial oxidative damage in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *J Poult Sci* 2007;44:439–45.

Mujahid A, Sato K, Akiba Y, Toyomizu M. Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content. *Poult Sci* 2006;85:1259–65.

Mujahid A, Sato K, Akiba Y, Toyomizu M. Acute heat stress stimulates mitochondrial superoxide production in broiler skeletal muscle, possibly via downregulation of uncoupling protein content. *Poult Sci* 2006;85:1259–65.

Nagashima H, Cameron RDA, Kuwama M, Young M, Beebe L, Blackshaw AW, Nottle MB (1999) Survival of porcine delipated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing and vitrification. *J Reprod Dev* 45:167–176

O'Brien JK, Beck NF, Maxwell WM, Evans G. Effect of hormone pre-treatment of prepubertal sheep on the production and developmental capacity of oocytes in vitro and in vivo. *Reprod Fertil Dev*. 1997a;9(6):625-31.

O'Brien JK, Catt SL, Ireland KA, Maxwell WM, Evans G. In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology*. 1997b May;47(7):1433-43.

O'Brien JK, Dwarte D, Ryan JP, Maxwell WM, Evans G. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod Fertil Dev*. 1996;8(7):1029-37.

Ogawa B, Ueno S, Nakayama N, Matsunari H, Nakano K, Fujiwara T, Ikezawa Y, Nagashima H. Developmental ability of porcine in vitro matured oocytes at the meiosis II stage after vitrification. *J Reprod Dev*. 2010 Jun;56(3):356-61

Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S, Arnone A, Cognigni GE, Filicori M. A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertil Steril*. 2012 Oct;98(4):870-5.

Parmegiani L, Bertocci F, Garello C, Salvarani MC, Tambuscio G, Fabbri R. Efficiency of human oocyte slow freezing: results from five assisted reproduction centres. *Reprod Biomed*

Online. 2009 Mar;18(3):352-9.

Parmegiani L, Bertocci F, Garello C, Salvarani MC, Tambuscio G, Fabbri R. Efficiency of human oocyte slow freezing: results from five assisted reproduction centres. *Reprod Biomed Online*. 2009 Mar;18(3):352-9.

Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, Tabarelli de Fatis C, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2011 Oct;23(4):505-12.

Pereira RM, Carvalhais I, Pimenta J, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Santos IC, Marques MR, Reis A, Pereira MS, Marques CC. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. *Anim Reprod Sci*. 2008 Jul;106(3-4):322-32.

Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, et al., 2000 Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*, 169: 33–37.

Portmann M, Nagy ZP & Behr B 2010 Evaluation of blastocyst survival following vitrification/warming using two different closed carrier systems. *Human Reproduction* 25 i261

Ptak G, Loi P, Dattena M, Tischner M, Cappai P. Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol Reprod*. 1999 Dec;61(6):1568-74.

Qiang X, Yang WL, Wu R, Zhou M, Jacob A, Dong W, Kuncewitch M, Ji Y, Yang H, Wang H, Fujita J, Nicastro J, Coppa GF, Tracey KJ, Wang P. Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis. *Nat Med*. 2013 Nov;19(11):1489-95.

Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313:573-5

Rao BS, Mahesh YU, Charan KV, Suman K, Sekhar N, Shivaji S. Effect of vitrification on meiotic maturation and expression of genes in immature goat cumulus oocyte complexes. *Cryobiology*. 2012 Jun;64(3):176-84.

Rho GJ, Kim S, Yoo JG, Balasubramanian S, Lee HJ, Choe SY. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*. 2002 Dec;63(4):464-70.

Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The oocyte. *Hum Reprod*. 2012 Aug;27 Suppl 1:i2-21

Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J et al., 2004. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 19: 655-659

Rojas C, Palomo MJ, Albaracìn JL, Moqas T. 2004. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules and actin microfilaments. *Cryobiology*. 49(3): 211-220.

Roldan ER, Gomendio M, Garde JJ, Espeso G, Ledda S, Berlinguer F, del Olmo A, Soler AJ, Arregui L, Crespo C, González R. Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: preservation of genetic variation through the Organization of Genetic Resource Banks. *Reprod Domest Anim*. 2006 Oct;41 Suppl 2:82-92.

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

Russo R, Monaco D, Rubessa M, El-Bahrawy KA, El-Sayed A, Martino NA, Beneult B, Ciannarella F, Dell'Aquila ME, Lacalandra GM, Filioli Uranio M. Confocal fluorescence assessment of bioenergy/redox status of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) oocytes before and after in vitro maturation. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Feb 18;12:16.

Santos RR, Amorim C, Cecconi S, Fassbender M, Imhof M, Lornage J, Paris M, Schoenfeldt V, Martinez-Madrid B. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Anim Reprod Sci*. 2010 Dec;122(3-4):151-63.

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

Saunders KM, Parks JE. 1999. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro matured bovine oocytes. *Biol Reprod*. 61(1): 178-187.

Schatten G, Schatten H. 1987. Cytoskeletal alterations and nuclear architectural changes during mammalian fertilization. *Current Topics in Developmental Biology*. 23: 23-54.

Schuh, M. & Ellenberg, J. A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Cur. Biol*. 18, 1986–1992 (2008)

Seyhan A, Ata B, Polat M, Son WY, Yarali H, Dahan MH. Severe early ovarian hyperstimulation syndrome following GnRH agonist trigger with the addition of 1500 IU hCG. *Hum Reprod* 2013;28:2522-8.

Shaughnessy DT, McAllister K, Worth L, Haugen AC, Meyer JN, Domann FE, Van Houten B, Mostoslavsky R, Bultman SJ, Baccarelli AA, Begley TJ, Sobol R, Hirschey MD, Ideker T, Santos JH, Copeland WC, Tice RR, Balshaw DM, Tyson FL. Mitochondria, Energetics, Epigenetics, and Cellular Responses to Stress. *Environ Health Perspect*. 2014 Aug 15.

Shi LY, Jin HF, Kim JG, Mohana KB, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ. Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. *Anim Reprod Sci* 2007;100:128 –140

Shiina, Y., Kaneda, M., Matsuyama, K., Tanaka, K., Hiroi, M., Doi, K., 1993. Role of the

extracellular Ca²⁺ on the intracellular Ca²⁺ changes in fertilized and activated mouse oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 97, 143–150.

Shirazi A, Taheri F, Nazari H, Norbakhsh-Nia M, Ahmadi E, Heidari B. Developmental competence of ovine oocyte following vitrification: effect of oocyte developmental stage, cumulus cells, cytoskeleton stabiliser, FBS concentration, and equilibration time. *Zygote*. 2014 May;22(2):165-73.

Silvestre MA, Yániz J, Salvador I, Santolaria P, López-Gatius F. Vitrification of pre-pubertal ovine cumulus-oocyte complexes: effect of cytochalasin B pre-treatment. *Anim Reprod Sci.* 2006 Jun;93(1-2):176-82

Simerly C, Navara CS, Wu GJ, Schatten G. Cytoskeletal organization and dynamics in mammalian oocytes during maturation and fertilization. In: Grudzinskas JG, Yovich JL, eds. *Gametes - The Oocyte*. Cambridge:Cambridge University Press.1995 pp 54–94.

Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, Alegretti JR, Motta EL. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril.* 2010 Nov;94(6):2088-95.

Somfai et al., 2011, Cytoskeletal Abnormalities in Relation with Meiotic Competence and Ageing in Porcine and Bovine Oocytes During in vitro Maturation.

Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, Dinnyes A, Nagai T, Kikuchi K. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology* 2007;55:115–126.

Spector I, Shochet NR, Blasberger D, Kashman Y. Latrunculins—novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 1989;13: 127–144.

Spector I, Shochet NR, Kashman Y, Groweiss A. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 1983; 219: 493–495

Stachecki JJ, Cohen J, Willadsen SM. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. *Cryobiology*. 1998 Dec;37(4):346-54.

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

Stephoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978 Aug 12;2(8085):366. PubMed PMID: 79723.

Succu S, Bebbere D, Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Leoni GG, Berlinguer F, Naitana S, Ledda S. Vitrification of in vitro matured ovine oocytes affects in vitro pre-implantation development

and mRNA abundance. *Mol Reprod Dev.* 2008 Mar;75(3):538-46.

Succu S, Berlinguer F, Leoni GG, Bebbere D, Satta V, Marco-Jimenez F, Pasciu V, Naitana S. Calcium concentration in vitrification medium affects the developmental competence of in vitro matured ovine oocytes. *Theriogenology.* 2011 Mar 1;75(4):715-21.

Succu S, Leoni GG, Bebbere D, Berlinguer F, Mossa F, Bogliolo L, Madeddu M, Ledda S, Naitana S. Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2007a Oct;74(10):1337-44

Succu S, Leoni GG, Berlinguer F, Madeddu M, Bebbere D, Mossa F, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S. Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes. *Theriogenology.* 2007b Jul 1;68(1):107-14.

Swann K, Ozil JP. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int Rev Cytol.* 1994;152:183-222

Tarin JJ, Gomez-Piquer V, Pertusa JF, Hermenegildo C, Cano A. Association of female aging with decreased parthenogenetic activation, raised MPF, and MAPKs activities and reduced levels of glutathione S-transferases activity and thiols in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004;69:402–410.

Tatone C, Di Emidio G, Vento M, Ciriminna R, Artini PG. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecol Endocrinol.* 2010 Aug;26(8):563-7

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. *Anim Reprod Sci.* 2007 Oct;101(3-4):365-71.

Tiwari BS, Belenghi B, Levine A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol.* 2002 Apr;128(4):1271-81

Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305:707–709.

Trudgen K, Ayensu-Coker L. Fertility preservation and reproductive health in the pediatric, adolescent, and young adult female cancer patient. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2014 Aug 23

Tsang WH & Chow KL 2009 Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *BioTechniques* 46 550–552.

Ushijima H, Yamakawa H, Nagashima H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. *Biol Reprod* (1999) 60:534–539

Vajita G, Holm P, Kuwayama M, et al. Open pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-8.

Vajta G, Holm P, Greve T & Callesen H 1997 Vitrification of porcine embryos using the open

pulled straw (OPS) method. *Acta Veterinaria Scandinavica* 38 349–352.

Van Blerkom J. Maturation at high frequency of germinal-vesicle stage mouse oocytes after cryopreservation: alterations in cytoplasmic, nuclear, nucleolar and chromosomal structure and organization associated with vitrification. *Hum Reprod.* 1989 Nov;4(8):883-98

Van Blerkom J. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jun 1;88(11):5031-5.

Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion.* 2011 Sep;11(5):797-813.

Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, Wisse E, Van Steirteghem A. Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod.* 1988 Nov;3(8):960-7

Van der Elst J, Van den Abbeel E, Nerinckx S, Van Steirteghem A. Parthenogenetic activation pattern and microtubular organization of the mouse oocyte after exposure to 1,2-propanediol. *Cryobiology.* 1992 Oct;29(5):549-62

Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaart V & Schoysman E, 2000, "In vitro" survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Fertility and Sterility* 74 S215–S216

Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999; 283: 1482-1488

Wang LY, Wang DH, Zou XY, Xu CM. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009 Jul;10(7):483-92.

Wen Y, Zhao S, Chao L, Yu H, Song C, Shen Y, Chen H, Deng X. The protective role of antifreeze protein 3 on the structure and function of mature mouse oocytes in vitrification. *Cryobiology.* 2014 Sep 28.

Whiteley GSW, Fuller BJ, Hobbs KEF. Lipid peroxidation in liver tissues specimens stored at subzero temperatures. *Cryo Lett* 1992;13:83–86.

Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature.* 1971 Sep 10;233(5315):125-6

Williams RJ, Shaw SK. The relationship between cell injury and osmotic volume reduction: II. Red cell lysis correlates with cell volume rather than intracellular salt concentration. *Cryobiology.* 1980 Dec;17(6):530-9

Wood BR, Chernenko T, Matthaus C, Diem M, Chong C, Bernhard U, et al. Shedding new light on the molecular architecture of oocytes using a combination of synchrotron fourier transm-infrared and Raman spectroscopic mapping. *Anal Chem.* 2008;80:9065–72.

Wu C, Rui R, Dai J, Zhang C, Ju S, Xie B, Lu X, Zheng X. Effects of Cryopreservation on the Developmental Competence, Ultrastructure and Cytoskeletal Structure of Porcine Oocytes,

Molecular reproduction and development 73:1454–1462 (2006)

Yan CL, Fu XW, Zhou GB, Zhao XM, Suo L, Zhu SE. Mitochondrial behaviors in the vitrified mouse oocyte and its parthenogenetic embryo: effect of Taxol pretreatment and relationship to competence. *Fertil Steril.* 2010 Feb;93(3):959-66.

Yarmola EG, Somasundaram T, Boring TA, Spector I and Bubb MR, Actin-Latrunculin A Structure and Function, *The journal of biological chemistry* Vol. 275, No. 36, Issue of September 8, pp. 28120–28127, 2000

Yi K, Li R. 2012. Actin Cytoskeleton in Cell Polarity and Asymmetric Division During Mouse Oocyte Maturation. *Wiley Periodicals Inc.* 1-11.

Yi K, Unruh JR, Deng M, Slaughter BD, Rubinstein B, Li R. 2011. Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nat Cell Biol.* 13(10): 1252-1258.

Yi, K., Rubinstein, B., Unruh, J. R., Slaughter, B. D. & Li, R. Sequential actin-based pushing forces drive meiosis I chromosome migration and symmetry breaking in oocytes. *J. Cell Biol.* 2013

Zander-Fox D, Cashman KS, Lane M. The presence of 1 mM glycine in vitrification solutions protects oocyte mitochondrial homeostasis and improves blastocyst development. *J Assist Reprod Genet.* 2013 Jan;30(1):107-16.

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

Zhang J, Nedambale TL, Yang M, Li J. Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. *Anim Reprod Sci.* 2009 Jan;110(1-2):46-55.

Zoladek AB, Johal RK, Garcia-Nieto S, Pascut F, Shakesheff KM, Ghaemmaghami AM, Notingher Label-free molecular imaging of immunological synapses between dendritic and T cells by Raman micro-spectroscopy. *Analyst.* 2010;135:3205-12.