



Unione europea
Fondo sociale europeo



REGIONE AUTÓNOMA DE SARDIGNA
REGIONE AUTÓNOMA DELLA SARDEGNA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

***SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE VETERINARIE***

INDIRIZZO: Riproduzione, patologia, allevamento e benessere animale (XXX CICLO)

Studio sulla crioconservazione: dalle cellule somatiche alle cellule staminali

**Docente Guida
Prof. Sergio Ledda**

**Direttore
Prof. Salvatore Naitana**

**Studente di dottorato
Antonella Idda**

Anno Accademico 2016-2017

La presente tesi è stata prodotta nell'ambito della Scuola di Dottorato in "Scienze Veterinarie" dell'Università degli Studi di Sassari, A.A. 2016/2017 – XXX ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1.

Indice

Elenco delle abbreviazioni.....	5
1 Introduzione.....	7
1.1 Criobiologia e crioconservazione: perché crioconservare?.....	7
1.2 Tre tecniche di congelamento: eventi fisici, pro e contro	9
1.3 Il target: cosa crioconservare	14
1.3.1 Cellule somatiche.....	14
1.3.2 Cellule staminali.....	15
1.3.3 Cellule germinali	17
1.4 Liofilizzazione o freeze-drying	18
1.5 Come e quando valutare l'efficacia della crioconservazione	20
1.5.1 Criomicroscopia	20
1.5.2 Analisi molecolari	20
1.6 Il modello ovino	23
2 Scopo del lavoro e disegno sperimentale	24
3 Materiali e metodi	26
3.1 Esperimento 1 (fibroblasti dermici)	26
3.1.1 Isolamento cellulare e coltura	26
3.1.2 Vitalità cellulare	27
3.1.3 Immunocitochimica	27
3.1.4 Curva di crescita cellulare.....	28
3.1.5 Preparazione dei campioni.....	28
3.1.6 Crioconservazione.....	28
3.1.6.1 Studi di criomicroscopia	29
3.1.6.2 Studi con il sistema Criocamera	31
3.1.7 Analisi dell'espressione genica.....	32
3.1.7.1 Isolamento del RNA e trascrizione inversa	33
3.1.7.2 Reazione a catena della polimerasi in tempo reale: Real Time PCR.....	33
3.1.8 Analisi statistica	35
3.2 Esperimento 2 (cellule della gelatina di Wharton)	36
3.2.1 Isolamento cellulare e coltura	36
3.2.2 Vitalità cellulare	37
3.2.3 Proliferazione cellulare.....	38
3.2.4 Crioconservazione.....	38
3.2.4.1 Preparazione dei campioni	39

3.2.4.2	Soluzioni di crioconservazione e tempi di equilibratura	40
3.2.4.3	Protocollo classico (C)	41
3.2.4.4	Protocollo lento-controllato (L)	42
3.2.4.5	Protocollo rapido (R)	42
3.2.5	Scongelamento	42
3.2.6	Conta vitale e coltura post crioconservazione	43
3.2.7	Differenziamenti cellulari	43
3.2.8	Analisi dell'espressione genica	46
3.2.8.1	Isolamento dell'RNA e trascrizione inversa	46
3.2.8.2	Real Time PCR	47
3.2.9	Analisi statistica	50
3.3	Esperimento 3 (seme)	50
3.3.1	Raccolta del seme	50
3.3.2	Preparazione del campione	50
3.3.3	Trattamento termico	51
3.3.3.1	Congelamento	51
3.3.3.2	Liofilizzazione parziale (Partial freeze-drying)	51
3.3.4	Analisi della cristallizzazione	52
3.3.4.1	Misurazioni al criomicroscopio: frazione non cristallizzata	52
3.3.4.2	Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)	53
3.3.5	Analisi statistica	53
4	Risultati	54
4.1	Esperimento 1 (fibroblasti dermici)	54
4.1.1	Vitalità, immunocitochimica e curve di crescita	54
4.1.2	Criomicroscopia e formazione del ghiaccio intracellulare	56
4.1.3	Espressione genica	58
4.2	Esperimento 2 (cellule della gelatina di Wharton)	60
4.2.1	Vitalità cellulare	60
4.2.2	Proliferazione cellulare	65
4.2.3	Capacità differenziativa: colorazione istochimica	67
4.2.4	Espressione genica	69
4.2.4.1	Staminalità, origine mesenchimale e immunogenicità	69
4.2.4.2	Differenziamento in senso mesodermico ed ectodermico	70
4.3	Esperimento 3 (seme)	71
4.3.1	Motilità cellulare	71

4.3.2	Frazione non cristallizzata in criomicroscopia	71
4.3.3	Struttura dei cristalli di ghiaccio al SEM.....	73
5	DISCUSSIONE.....	74
5.1	FIBROBLASTI DERMICI	75
5.1.1	Isolamento e caratterizzazione dei fibroblasti	75
5.1.2	Vitalità post crioconservazione	76
5.1.3	Gli eventi fisici della crioconservazione	76
5.1.4	Espressione genica post crioconservazione.....	78
5.1.5	Conclusioni sui fibroblasti dermici	80
5.2	CELLULE MESENCHIMALI STROMALI DELLA GELATINA DI WHARTON.....	81
5.2.1	Isolamento e proliferazione delle oWJC	81
5.2.2	Caratterizzazione delle oWJC	82
5.2.3	Capacità differenziativa delle oWJC.....	84
5.2.4	Crioconservazione delle oWJC	85
5.2.4.1	Vitalità cellulare post crioconservazione	86
5.2.4.2	Caratterizzazione, multipotenza e capacità differenziativa delle oWJC crioconservate	88
5.2.5	Conclusioni sulle oWJC	90
5.3	SEME OVINO	91
6	CONCLUSIONI GENERALI	95
	Bibliografia:.....	97
7	APPENDICE	104
	Liquid Marble: un lavoro collaterale	104
	Ringraziamenti.....	111

Elenco delle abbreviazioni

AI: artificial insemination
 α -MEM: alpha-minimum essential medium
ASC: adult stem cell
BSA: bovine serum albumin
CASA: computer assisted sperm analysis
CC: criocamera
CD: cell doubling
CM: cryomicroscope
COL1A1: collagen type I alpha 1 chain
CPA: cryoprotective agent
DMSO: dimethyl sulfoxide
DNA: deoxyribonucleic acid
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EG: ethylene glycol
EGF: epidermal growth factor
EIF: extracellular ice formation
ESC: embryonic stem cell
FBS: fetal bovine serum
FD: freeze-drying
fps: frame per second
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HG-DMEM: High Glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ICM: inner cell mass
ICSI: intra-cytoplasmic sperm injection
IIF: intracellular ice formation
iPS (iPSC): induced pluripotent stem (cells)
ISCT: international society for cellular therapy
IVF: in vitro fertilization
LPL: lipoprotein lipase

MSC: mesenchymal stem cell / mesenchymal stromal cell

NANOG: Nanog homeobox

NEFL: neurofilament light

NEFM: neurofilament medium

oAEC: ovine amniotic epithelial cells

OCN/ BGLAP: osteocalcin/ bone gamma-carboxyglutamate protein

OCT4/POU5F1: organic cation_carnitine transporter4 / POU class 5 homeobox 1

oWJC: ovine Wharton's jelly cells

PBS: phosphate buffered saline

PDT: population doubling time

PFD: partial freeze-drying

PIIF: probability of intracellular ice formation

PPARG: peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PVA: polyvinyl alcohol

SOX2: SRY (sex determining region Y)-box 2

SCNT: somatic cell nuclear transfer

TERT: telomerase reverse transcriptase

UF: unfrozen fraction

1 Introduzione

1.1 Criobiologia e crioconservazione: perché crioconservare?

Il termine criobiologia (dal greco κρύος “freddo, gelo” e βίος “vita”) definisce una branca della scienza la cui materia riguarda lo studio dell’applicazione di temperature estremamente basse, dette criogeniche, al mondo vivente. Il freddo e i suoi effetti sono al contempo l’oggetto e il mezzo attraverso i quali la criobiologia indaga la vita.

Tali indagini possono essere schematizzate in due macroaree definite crioterapia e crioconservazione.

La crioterapia, detta anche criochirurgia o crioablazione, è una tecnica chirurgica che impiega temperature criogeniche per distruggere in maniera selettiva e poco invasiva cellule e tessuti indesiderati, come nel caso dei tumori e di altre patologie (Gage and Baust, 2007), (Cooper and Dawber, 2001),(Yiu et al., 2007). Lo scopo è quello di indurre un danno letale a livello cellulare così da rimuovere in via definitiva la componente patologica.

All’opposto, la crioconservazione ha come fine la preservazione della sopravvivenza, della funzionalità e dell’integrità genomica delle cellule e dei tessuti di interesse (Asghar et al., 2014). Questo è possibile attraverso la realizzazione di varie procedure che mirano ad eliminare, o nel concreto a rendere più inoffensivi, quei fattori che risultano lesivi per la componente biologica.

Tuttavia, tali fattori sono intrinseci al processo di cambiamento di stato dell’acqua, dalla fase liquida a quella solida, che si realizza con l’esposizione a temperature sotto lo zero. L’acqua allo stato liquido costituisce la componente principale dei sistemi viventi. Essa cessa di esistere a temperature inferiori a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$, alle quali può presentarsi esclusivamente allo stato cristallino o vitreo (viscosità $>10^3$ poise). In condizioni così estreme i processi di diffusione, i moti e le collisioni delle molecole coinvolte nelle reazioni biochimiche sono completamente impediti.

L’azoto allo stato liquido (LN_2) è il mezzo d’elezione impiegato in campo criobiologico. Esso origina dall’azoto gassoso (N_2), l’elemento più abbondante dell’atmosfera terrestre (78 %) che, in condizioni di pressione elevata, può essere indotto a subire un cambiamento di stato verso la forma liquida, caratterizzata dall’aver un punto di ebollizione molto basso ($-195,82\text{ }^{\circ}\text{C}$).

I criobiologi “crioconservatori” usufruiscono di questa interessante proprietà del LN₂ per portare i sistemi biologici in una condizione di “animazione sospesa” indotta dalle basse temperature.

Peter Mazur (1928-2015), uno dei padri della criobiologia, adottò quest’espressione in riferimento alla crioconservazione delle cellule viventi (Mazur, 1984). Tale terminologia fa riferimento ad uno stato di rallentamento o di arresto temporaneo delle funzioni vitali. In natura coincide con la condizione sperimentata ciclicamente dagli animali e dai vegetali che vanno in uno stato letargico.

Come questi organismi più complessi, anche le cellule crioconservate entrano in uno stato di stand-by. L’insufficiente energia termica presente alla temperatura di circa -196 °C del LN₂ mette in pausa le reazioni chimiche (McGee and Martin, 1962) e il tempo idealmente viene bloccato.

Questa condizione permette di poter mantenere le cellule, o i tessuti da esse composti, in una condizione di latenza funzionale per lunghi periodi. Infatti, la durata dell’intervallo di permanenza a temperature criogeniche sembra essere ininfluenza sul ripristino della funzionalità cellulare (Ashwood-Smith and Friedmann, 1979). Le cellule, quindi, possono essere risvegliate dallo stato di ibernazione e ricondotte nel tempo reale in qualsiasi momento si renda necessaria una disponibilità immediata del materiale conservato.

Il biobanking rappresenta la principale applicazione su vasta scala delle tecniche di crioconservazione. Le banche di materiale crioconservato possono essere costituite dalle riserve di poche linee cellulari allestite dai singoli laboratori, dalle banche di materiale biologico di varia natura raccolto da enti specializzati (<http://www.bbmri.it/biobanche>), fino alle grandi collezioni delle banche della biodiversità (vedi la Svalbard Global Seed Vault per il germoplasma), delle banche di tessuti tumorali (Yu and Zhu, 2010) e di quelle di cellule staminali (Mayor, 2004).

La pratica di conservare cellule di valore, sia a scopi di ricerca sia per applicazioni in campo clinico, ha come indubbio vantaggio quello di consentire l’accesso al materiale biologico di interesse in tempi rapidi, oltrepassando la necessità di reperire materiale fresco non sempre disponibile.

In questo senso la crioconservazione costituisce spesso una tappa fondamentale per attività successive e può essere propedeutica alla realizzazione di soluzioni cliniche per la cura di

patologie. Può infatti essere combinata alla rigenerazione di tessuti nei trapianti autologhi o allogenici (Kearney, 1991),(Naaldijk et al., 2013), alle pratiche di trasferimento nucleare di cellule somatiche (SCNT), alla generazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) (Cetinkaya and Arat, 2011), alla conservazione di specie a rischio di estinzione (Leon-Quinto et al., 2014),(Berlinguer et al., 2005) e alle tecniche di riproduzione assistita (Cobo and Diaz, 2011),(Succu et al., 2007).

La ricerca di base sui materiali crioconservati può invece riguardare studi sul legame tra le peculiarità cellulari e i meccanismi fisici che intervengono nelle fasi del protocollo termico, come gli studi sulla probabilità di formazione del ghiaccio intracellulare (PIIF), sulle variazioni volumetriche, sulla permeabilità ai crioprotettori (Yi et al., 2014),(Spindler et al., 2012),(Xu et al., 2014), o ancora studi sui meccanismi di risposta cellulare al danno in termini di sopravvivenza, espressione genica e configurazione epigenetica (Liu et al., 2000), (Chatterjee et al., 2017).

Un ulteriore plus della crioconservazione è dato dalla protezione delle cellule da eventuali contaminazioni alle quali sarebbero esposte durante i continui passaggi in coltura. La stessa coltura *ex vivo* a lungo termine può inoltre essere all'origine di altre condizioni indesiderate quali deriva genotipica, aberrazioni cromosomiche, instabilità fenotipica e alterazioni epigenetiche (Ben-David et al., 2011),(Vacanti et al., 2005). La crioconservazione permette inoltre di risparmiare tempo e risorse economiche richiesti dal mantenimento in coltura.

1.2 Tre tecniche di congelamento: eventi fisici, pro e contro

Perché una procedura di crioconservazione possa dirsi efficace è necessario che le cellule sopravvivano sia alla riduzione termica sia al ripristino della temperatura omeostatica, riacquisendo inalterate le proprietà funzionali e strutturali possedute in precedenza.

Come accennato, durante il processo di crioconservazione possono verificarsi alcuni eventi in grado di compromettere la buona riuscita della procedura.

Questi eventi dannosi sono legati alla componente acquosa delle cellule e del mezzo che le circonda e sono dovuti alla formazione del ghiaccio nei compartimenti intra e extracellulare

(rispettivamente IIF e EIF) e alla disidratazione delle cellule, secondo l'ipotesi a due fattori proposta da Mazur (Mazur et al., 1972).

Si parla di danno meccanico in relazione alla pressione esercitata dalla formazione e dalla crescita dei cristalli di ghiaccio nel mezzo extracellulare (tra $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$). I cristalli si accrescono con il progredire della discesa termica e costringono le cellule in angusti canali di soluzione non cristallizzata (Mazur, 1984). La frazione liquida contenuta nei canali va incontro ad un progressivo innalzamento della concentrazione dei soluti in essa disciolti, a seguito del sequestro dell'acqua nelle strutture cristalline del ghiaccio. Si realizza così un tipo di danno definito osmotico o effetto soluzione, che origina dal richiamo di acqua dal compartimento intracellulare verso quello extracellulare e che priva le strutture biologiche del loro stato di idratazione (Pegg, 1987).

Contrariamente a quanto si potrebbe pensare, la fase critica per la sopravvivenza cellulare non riguarda la permanenza alle temperature estreme raggiunte nel processo di crioconservazione ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), quanto piuttosto il passaggio delle cellule attraverso l'intervallo di temperatura compreso tra $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, che esse attraversano due volte nell'arco di un protocollo termico (in fase di raffreddamento e di riscaldamento). In questa fascia di temperatura, il destino delle cellule tra IIF e disidratazione è direttamente collegato alla velocità di raffreddamento (cooling rate).

Sulla base della velocità di raffreddamento è possibile distinguere tre tecniche di crioconservazione: congelamento lento, congelamento rapido e congelamento ultrarapido o vitrificazione.

Schematizzando, una velocità di raffreddamento lenta ($\leq 5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) favorisce la disidratazione cellulare, mentre velocità rapide ($> 5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) inducono la formazione di ghiaccio intracellulare. La vitrificazione oltrepassa la IIF esasperando la discesa termica con velocità elevate ($\geq 10000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) per favorire la formazione di uno stato amorfo solidificato, detto vitreo, privo del reticolo cristallino del ghiaccio. Il comportamento cellulare varia in relazione alla velocità di raffreddamento applicata. Questo influisce sia sul grado con cui si verificano fenomeni di nucleazione del ghiaccio intracellulare, sia sulla scala dimensionale dei cristalli e, di conseguenza, sulla gravità del danno determinato dall'azione diretta del ghiaccio (Figura 1.1).

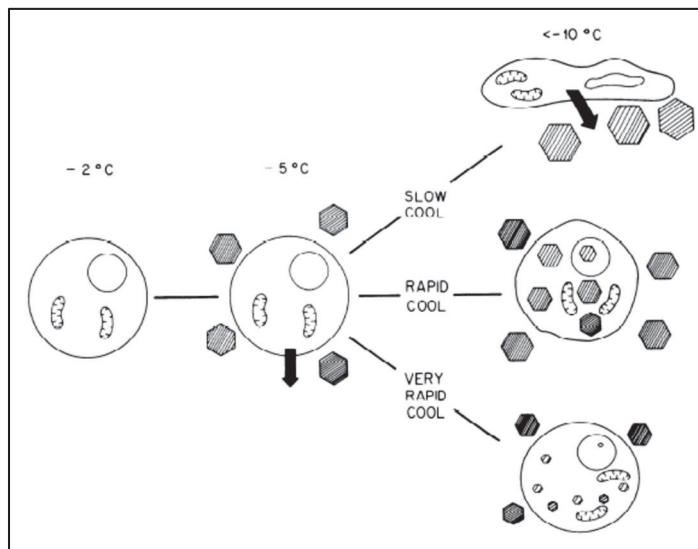


Figura 1.1. Rappresentazione schematica degli eventi fisici che si verificano durante il congelamento. Immagine tratta da Mazur 1984 (Mazur, 1984).

Un ulteriore elemento che distingue le tecniche citate riguarda la concentrazione degli agenti crioprotettori utilizzati (CPA). Questa categoria comprende sostanze, di diversa natura chimica, che sono addizionate al terreno di crioconservazione. I CPA hanno la funzione di proteggere le cellule da elevate concentrazioni di elettroliti e di ridurre la formazione del ghiaccio intracellulare tramite l'abbassamento crioscopico della temperatura di congelamento.

Le tecniche di congelamento lento impiegano basse concentrazioni di crioprotettore ($\leq 10\%$ vol), mentre nella vitrificazione sono utilizzate miscele di CPA che raggiungono concentrazioni intorno al 30 %vol.

Nonostante la loro azione protettiva, anche i CPA possono essere fonte di danno dovuto a fenomeni di citotossicità che sono dipendenti da dose, temperatura e tempi di contatto. Si parla di danno tossico (Wang et al., 2007).

Lo sviluppo di un protocollo di crioconservazione ottimale mira a ridurre al minimo l'effetto deleterio del danno meccanico, osmotico e tossico al fine di mantenere inalterate nella maggior parte delle cellule le proprietà originarie.

La scelta del tipo e della concentrazione di CPA, la velocità di raffreddamento, la velocità di riscaldamento e in generale la tipologia di tecnica di crioconservazione da adottare varia a seconda del tipo cellulare da preservare.

Gli studi di Mazur e colleghi hanno dimostrato che, per tipi cellulari diversi, la relazione tra sopravvivenza e velocità di raffreddamento restituisce un grafico che ha la forma di una “U” invertita (Mazur, 1984). Per ogni tipo cellulare esiste una velocità di raffreddamento ottimale, rappresentata dal punto più alto della U invertita, e una serie di velocità non ottimali, minori e maggiori, alle quali la sopravvivenza cellulare è ridotta. La spiegazione è dovuta all’esistenza di una relazione di equilibrio che coinvolge la concentrazione dei CPA e la velocità di riscaldamento. La prima risulta deleteria quando combinata con velocità di raffreddamento ridotte (danno osmotico), la seconda è fonte di danno in relazione ai fenomeni di ricristallizzazione e quindi alla IIF (Figura 1.2). Inoltre, la posizione della U lungo l’asse delle cooling rate differisce a seconda del tipo cellulare, a significare che ogni cellula necessita di condizioni tipo-specifiche per poter sopravvivere (Figura 1.3).

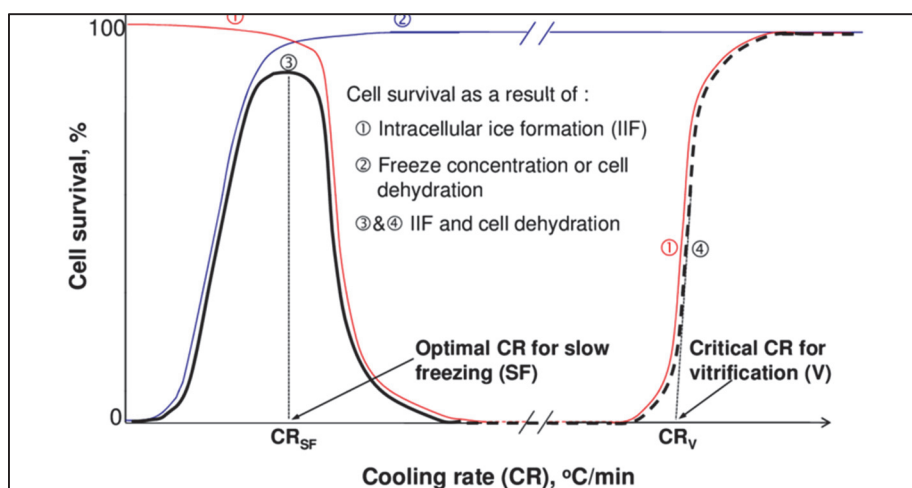


Figura 1.2. Sopravvivenza cellulare in funzione della velocità di raffreddamento. La curva di sopravvivenza a forma di “U” invertita è scomposta nelle due componenti dovute all’effetto soluzione (braccio sinistro, linea blu) e all’IIF (braccio destro, linea rossa). Immagine tratta da He 2011, (He, 2011).

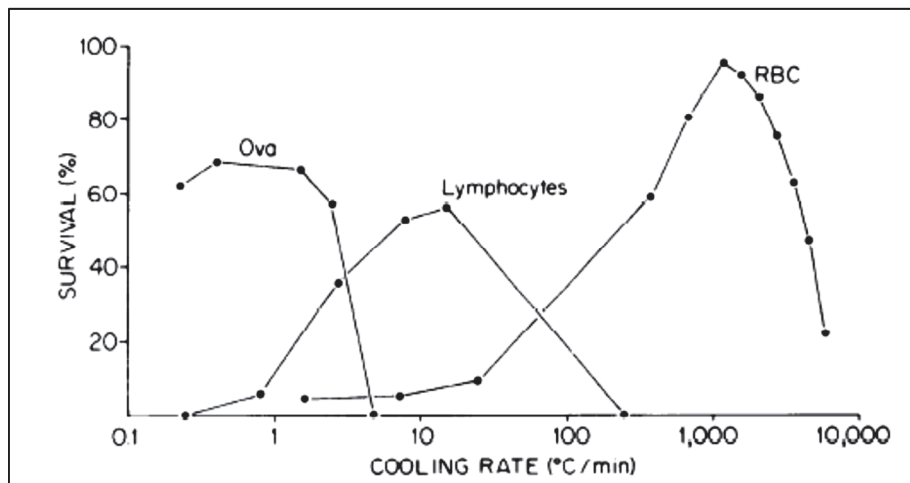


Figura 1.3. Sopravvivenza cellulare vs. velocità di raffreddamento in oociti, linfociti e eritrociti. Immagine tratta da Mazur 1984, (Mazur, 1984).

La composizione della cellula in termini di macromolecole (es: lipidi citoplasmatici e di membrana) e la stessa dimensione e struttura cellulare (es: oociti vs. spermatozoi) costituiscono degli elementi di primaria importanza da tenere in considerazione durante l'allestimento di un protocollo di crioconservazione (Ruffing et al., 1993).

Il rapporto tra l'area superficiale e il volume di una cellula (A/V) è forse il primo parametro che permette di orientare la scelta sulle caratteristiche del profilo termico da adottare. Tale rapporto risulta direttamente proporzionale alla frazione di acqua persa dal compartimento intracellulare durante la fase di raffreddamento. Per esempio, per A/V ridotti (v. oociti), con conseguente ridotta permeabilità all'acqua, sono necessarie velocità di raffreddamento elevate per evitare la IIF. In questi casi la vitrificazione costituisce una valida alternativa alle pratiche di congelamento lento.

Da quanto riportato, ne consegue che la tecnica e le condizioni da adottare necessitano di essere selezionate e costruite sulla base della cellula target che si intende crioconservare.

1.3 Il target: cosa crioconservare

Gli organismi complessi sono costituiti da cellule specializzate diverse per struttura e funzione. La crioconservazione può avere come oggetto cellule isolate appartenenti ad una popolazione omogenea (Fong et al., 2015), tessuti (Bakhach, 2009) ed anche organi (Fahy et al., 2004),(Bruinsma et al., 2015). La vitalità di queste componenti biologiche, intesa come pieno possesso delle funzionalità e delle strutture fisiologiche, rappresenta un requisito necessario per il successo della conservazione. Pertanto, la preservazione *post mortem* di interi organismi in LN₂, definita crionica, esula nei suoi presupposti dalla definizione standard di crioconservazione. La conservazione crionica si basa sulle conoscenze attuali in previsione di miglioramenti conoscitivi e tecnologici futuri che permettano di invertire questo processo. Tuttavia, allo stato dell'arte essa può essere considerata una speculazione sia teorica che economica in quanto, come detto, le condizioni vitali da ripristinare devono essere una condizione immanente presente *ab ovo*. Inoltre, l'intero arco del processo di conservazione necessita di una conoscenza approfondita e di essere finemente regolato, tanto più quanto la struttura diventa complessa per architettura e composizione eterogenea di elementi cellulari. La presente trattazione focalizza l'attenzione sulla crioconservazione di elementi cellulari appartenenti a tre distinte categorie.

1.3.1 Cellule somatiche

Le cellule somatiche (dal greco σωματικός, derivato di σῶμα -ατος "corpo") sono le unità morfofunzionali di base che costituiscono il corpo di un organismo vivente.

Tra le cellule somatiche da preservare, la crioconservazione di fibroblasti riveste un ruolo rilevante in considerazione della vasta gamma di settori nei quali tali cellule trovano applicazione. Essi possiedono caratteristiche quali una buona adattabilità alle condizioni di coltura in vitro, resistenza alle manipolazioni ed ai fenomeni di senescenza.

In ambito biotecnologico i fibroblasti sono stati i primi protagonisti nella produzione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) (Takahashi et al., 2007).

Nei protocolli di clonaggio realizzato con le metodiche di SCNT, i fibroblasti trovano una fertile applicazione anche nella conservazione di specie a rischio di estinzione (Leon-Quinto et al.,

2014). Infatti, come auspicato già dai primi anni '80, la salvaguardia delle specie a rischio di estinzione richiede l'allestimento di collezioni di materiale crioconservato (Veprintsev, B.N. and Rott, N.N. (1980) *Genome Conservation*, Academy of Sciences of the USSR, Puschino, pp. 1–49). Gran parte di queste collezioni sono costituite da fibroblasti, in quanto l'isolamento può avvenire dal prelievo di una rapida e poco invasiva biopsia dermica. Le cellule possono essere disponibili per intraprendere studi evolutivi, sui rapporti genetici tra individui, di citogenetica e nella ricerca di patogeni.

Inoltre, in quanto componenti attivi nel mantenere l'integrità e l'omeostasi del tessuto connettivo, i fibroblasti sono impiegati nella creazione di tessuti artificiali da usare come protesi cutanee nel trattamento delle ustioni (Naaldijk et al., 2013),(Kearney, 1991),(Wang et al., 2007), nella medicina estetica (Mehrabani and Manafi, 2013) ed anche nei saggi per lo sviluppo di farmaci, cosmetici e reagenti chimici (Wang et al., 2007), (Liu et al., 2000). Infine, i fibroblasti sono stati recentemente impiegati in esperimenti di cambiamento fenotipico indotto da modificatori epigenetici (Pennarossa et al., 2013),(Brevini et al., 2016).

Tutte le attività citate sono sostenute e giustificano i programmi di crioconservazione di questo tipo cellulare.

1.3.2 Cellule staminali

Una cellula staminale (dal latino stamen -mīnis «stame, filo» (inteso qui come principio germinale e costitutivo di organismi viventi), per traduzione del tedesco Stammzelle (composto di Stamm «stipite» e Zelle «cellula») è una cellula primitiva, non specializzata, indifferenziata, in grado di dare origine alle cellule differenziate che compongono un organismo.

Sulla base delle capacità differenziative si possono distinguere quattro tipi di cellule:

- totipotenti, in grado di originare un intero organismo (ad oggi solo lo zigote);
- pluripotenti, capaci di generare cellule appartenenti ai tre foglietti germinativi (es: cellule della massa interna della blastocisti, ICM);
- multipotenti, preposte alla differenziazione di cellule appartenenti ad una o più linee differenziative (es: cellule staminali emopoietiche);

- unipotenti, in grado di dare origine ad un solo tipo cellulare (es: cellule staminali dell'epidermide).

In base all'origine tissutale, le staminali si distinguono in embrionali (ESC) isolate dalla ICM, fetali provenienti dal feto, extra-fetali derivate dagli annessi fetali e adulte (ASC) derivate dai tessuti maturi. A quest'elenco possono essere aggiunte le iPS create artificialmente in laboratorio (Takahashi et al., 2007).

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) possono essere classificate come staminali multipotenti adulte. Il nome fu coniato nel 1991 per designare delle cellule non emopoietiche di origine mesodermica trovate nel midollo osseo (Caplan, 1991). Tale terminologia è stata ritenuta da alcuni inappropriata in quanto riferita a cellule del midollo osseo con limitata capacità differenziativa. Per questa ragione alcuni autori riferiscono alla sigla MSC la definizione di cellule mesenchimali stromali (Marquez-Curtis et al., 2015). È attualmente riconosciuto e accettato che le colture primarie di MSC siano composte da una popolazione eterogenea di cellule con distinte capacità di autorigenerazione e differenziamento (Ho et al., 2008),(Phinney, 2012). L'identificazione delle MSC, in assenza di marcatori univoci, è stata definita sulla base di tre criteri (Dominici et al., 2006):

- adesione alle superfici di plastica dei contenitori di coltura;
- capacità differenziativa nelle linee adipogenica, osteogenica e condrogenica a seguito di induzione;
- espressione dei marcatori CD73, CD90, CD105 e assenza di CD34, CD45, CD14 e HLA-DR.

Queste cellule hanno dimostrato promettenti applicazioni nei settori della terapia cellulare, della rigenerazione tissutale e dell'immunomodulazione.

Le MSC possono essere isolate da tessuti extra fetali considerati di scarto quali placenta, membrana amniotica e cordone ombelicale. Il prelievo risulta non invasivo, eticamente accettabile ed economicamente conveniente.

Le cellule estratte dalla matrice gelatinosa del cordone ombelicale, chiamata gelatina di Wharton, possiedono caratteristiche quali una rapida proliferazione e buone capacità di espansione in vitro (Fong et al., 2010).

Nonostante questo tessuto sia facilmente reperibile, la crioconservazione delle cellule della gelatina di Wharton (WJC), così come per le altre MSC, si rende necessaria in considerazione di:

- allestimento di riserve per trapianti autologhi ad uso futuro;
- catalogazione delle linee cellulari sulla base dei gruppi HLA nel trapianto allogenico;
- trasporto tra strutture di raccolta e centri di trapianto;
- tempi necessari per lo screening di patologie trasmissibili da donatore a ricevente;
- riduzione della costante necessità di un tessuto fresco;
- allestimento di controlli di qualità e standardizzazioni tra lotti della stessa preparazione cellulare;
- ottenimento di una sorgente di referenza per validare saggi di laboratorio.

1.3.3 Cellule germinali

Il termine cellule germinali (dal latino medievale *germinalis*, derivato di *germen* -mīnis «germe»), dette anche gameti (dal greco γαμέτης “coniuge”, der. di γαμέω “sposare”), identifica le cellule deputate alla riproduzione e distinte, secondo il sesso dell’individuo, in gamete femminile (oocita/macrogamete/uova/ovocellula) e gamete maschile (spermatozoo/spermio/ seme).

È interessante notare che gran parte della ricerca nel campo della crioconservazione e forse il maggior impatto applicativo di questa tecnica è rivolto al campo della medicina riproduttiva (Pegg, 2002). Le origini delle metodiche di crioconservazione moderne possono essere fatte risalire al 1948 quando Polge e Parkes scoprirono in un caso di serendipity l’azione crioprotettiva del glicerolo nella conservazione a -70°C di seme avicolo (Polge et al., 1949).

Il rapporto tra preservazione dei gameti e biotecnologie riproduttive è messo in luce da tecniche quali l’inseminazione artificiale (AI), la fecondazione in vitro (IVF) e l’iniezione di seme intracitoplasmatica (ICSI) che spesso si avvalgono dell’impiego di materiale crioconservato.

La crioconservazione dei gameti risulta essenziale per la preservazione del potenziale riproduttivo in soggetti ipofertili, a scopo preventivo in vista di terapie oncosoppressive, come

alternativa etica alla crioconservazione di embrioni e, in campo animale, nell'allestimento di banche per la salvaguardia di specie locali o a rischio di estinzione e nei programmi di miglioramento genetico (Berlinguer et al., 2005).

Tuttavia, la crioconservazione dei gameti presenta ancora notevoli sfide che richiedono il miglioramento delle procedure esistenti.

Infatti, la crioconservazione dell'oocita, eseguita principalmente tramite vitrificazione, può determinare alterazioni citoscheletriche, modificazioni dello stato ossido-riduttivo, alterazioni dei livelli di espressione genica e dell'omeostasi del calcio (Shi et al., 2007), (Bogliolo et al., 2015), (Succu et al., 2008).

Nel seme l'esposizione a temperature sottozero può determinare la mortalità di un'elevata percentuale del campione, danni alle membrane, aumentata sensibilità agli stress ambientali e riduzione della motilità, andando a compromettere la possibilità di interagire con il gamete femminile e di fertilizzare (Sieme et al., 2015),(Maxwell and Watson),(Hammerstedt et al., 1990).

Per questi motivi il miglioramento nel campo delle biotecnologie riproduttive passa anche attraverso lo sviluppo di metodiche di crioconservazione dei gameti sempre più raffinate. La sensibilità dei gameti alle procedure convenzionali di crioconservazione stimola la ricerca verso soluzioni alternative finalizzate alla preservazione a lungo termine delle risorse riproduttive.

In riferimento al gamete maschile, la tecnica della liofilizzazione emerge come soluzione promettente nel fornire un sostanziale contributo al biobanking, al trasporto e distribuzione dei campioni.

1.4 Liofilizzazione o freeze-drying

La liofilizzazione, il cui processo è meglio descritto dall'espressione inglese freeze-drying, è una tecnica che consente di sottrarre acqua da un prodotto idratato attraverso un procedimento di sublimazione. L'acqua allo stato solido subisce una trasformazione verso lo stato di vapore quando si realizzano tre condizioni essenziali: congelamento, riduzione della pressione a valori inferiori rispetto al punto triplo dell'acqua (<6,10 mbar= 4,58 mmHg), somministrazione di calore. La dimensione dei cristalli di ghiaccio formati durante la prima

fase di congelamento influisce sulla velocità di sublimazione. Velocità di congelamento troppo rapide determinano la formazione di cristalli di ghiaccio nel compartimento intracellulare con conseguente sublimazione lenta e non ottimale, mentre cooling rate ridotte determinano la formazione di cristalli di grandi dimensioni, facilmente disponibili alla sublimazione ma anche responsabili di un danno meccanico dovuto a compressione cellulare.

La metodica prevede che la formazione dei cristalli di ghiaccio sia immediatamente seguita dalla sublimazione dell'acqua, la quale è immobilizzata in forma solida su serpentine raffreddate. Nel freeze-drying propriamente detto (FD) è necessario introdurre un ultimo passaggio chiamato essiccamento secondario, durante il quale il contenuto d'acqua del materiale liofilizzato è ridotto dal 10% a $\leq 3\%$. Ad eccezione di alcune modifiche strutturali, il prodotto liofilizzato mantiene inalterate le proprietà di partenza e può essere conservato a temperatura ambiente fino al momento della reidratazione, in assenza di azoto o altri refrigeranti, riducendo i costi di mantenimento e quelli di spedizione. La procedura, che ha trovato largo impiego in campo farmaceutico e alimentare, è realizzata fisiologicamente da alcuni organismi definiti anidrobionti. Essi sono in grado di sopravvivere riducendo il contenuto d'acqua interna fino al 98-99%. Questo fenomeno è stato definito come il maggiore stress connesso alla carenza d'acqua in quanto la rimozione del solvente biologico per eccellenza determina una condizione di stress strutturale, fisiologico e biochimico (Gil et al., 2014).

I primi esperimenti nella conservazione cellulare tramite FD risalgono alla metà del XX secolo. Negli ultimi 10 anni l'applicazione del freeze-drying in campo medico è stata riscoperta e proposta come tecnica innovativa nella preservazione del gamete maschile (Olaciregui and Gil, 2017). I successi riscontrati in campo veterinario (Wakayama and Yanagimachi, 1998), (Loi et al., 2008) hanno aperto la strada alla sperimentazione in campo umano (Gianaroli et al., 2012).

Tuttavia, tale procedura non risulta priva di effetti indesiderati. Negli esperimenti condotti sul seme di diverse specie è stata osservata una pressoché totale perdita della motilità degli spermatozoi. A questo sono da aggiungere i danni alle membrane cellulari determinati sia dal congelamento istantaneo sia dalla procedura di essiccamento (Gil et al., 2014). Per quanto concerne l'integrità del genoma alcuni autori riportano segni evidenti di frammentazione del DNA (Olaciregui and Gil, 2017) mentre altri sostengono che la procedura non incida

sull'integrità dell'acido desossiribonucleico (Gianaroli et al., 2012) e quindi possa essere impiegata con successo nelle procedure di fecondazione condotte con la metodica dell'ICSI (Kaneko et al., 2014), (Patrick et al., 2017).

Il miglioramento della resa in termini di riduzione del danno causato dal FD necessita della modulazione di parametri operativi quali temperatura, pressione, essiccamento e composizione delle soluzioni di liofilizzazione. In particolare, la riduzione degli eventi determinanti un danno meccanico alle strutture cellulari, quali la membrana e la cromatina, potrebbe beneficiare di una procedura di liofilizzazione parziale.

1.5 Come e quando valutare l'efficacia della crioconservazione

Le analisi della vitalità cellulare tramite saggi dell'integrità di membrana o misurazioni dell'attività metabolica (Pegg, 1989), rappresentano il principale parametro che può essere valutato per stimare gli effetti della crioconservazione. Tuttavia, la loro utilità è limitata perché non possono fornire un quadro completo della complessità delle reazioni che sono innescate. Per questo è necessario valutare parametri aggiuntivi.

1.5.1 Criomicroscopia

Le moderne apparecchiature criomicroscopiche (Diller and Cravalho, 1970) consentono lo studio dei cambiamenti biofisici che si realizzano durante le fasi raffreddamento e riscaldamento di un protocollo termico. Questi strumenti permettono di visualizzare in tempo reale le modificazioni che intervengono nelle cellule e nell'ambiente circostante, fornendo un contributo sostanziale alla comprensione dei fenomeni alla base del congelamento.

1.5.2 Analisi molecolari

La crioconservazione rappresenta una fonte di stress per i sistemi biologici. Le cellule rispondono alle sollecitazioni osmotiche, meccaniche e tossiche generate dall'insieme delle condizioni di conservazione attraverso la modulazione dell'espressione genica. Alcuni geni

sono attivati come risposta diretta ai cambiamenti termici (heat shock genes), altri ancora intervengono nella risposta apoptotica, nella modulazione del metabolismo.

Lo studio dei geni coinvolti nella pluripotenza e nella capacità differenziativa delle cellule staminali riveste un ruolo rilevante nella valutazione dell'impatto esercitato della crioconservazione. Di seguito è riportata una descrizione dei geni indagati nel presente lavoro durante la realizzazione dell'esperimento sulle cellule cordonali ovine.

Geni staminali

Il fattore di trascrizione organic cation/carnitine transporter 4 (OCT4) è codificato dal gene *POU class 5 homeobox 1 (POU5F1)* ed è noto per essere un regolatore pleiotropico dell'espressione genica nelle cellule staminali embrionali coinvolto nel mantenimento dello stato indifferenziato (Wu and Scholer, 2014). Inoltre è incluso nella tetraide dei geni essenziali per indurre la pluripotenza nelle cellule differenziate (Takahashi et al., 2007). Come tale è largamente impiegato in qualità di marcatore della potenza differenziativa delle linee staminali verso i tre strati germinali.

Il gene *SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2)* appartiene ad una numerosa famiglia di geni espressi a livello embrionale e possiede una sequenza altamente conservata che codifica per un fattore di trascrizione coinvolto nelle reti regolatorie legate allo sviluppo, all'omeostasi di vari tessuti e all'autorinnovamento cellulare, in particolare nel sistema nervoso (Feng and Wen, 2015). Nell'ovino il principale sito di espressione di *SOX2* è costituito dal cervello fetale ma tracce del trascritto sono state rinvenute anche durante lo sviluppo delle creste genitali (Payen et al., 1997). Insieme ad OCT4 e al Nanog homeobox (*NANOG*) è uno dei fattori adoperati nella riprogrammazione cellulare (Yu et al., 2007).

Il prodotto proteico di *NANOG* costituisce un componente centrale della rete trascrizionale legata alla pluripotenza e risulta fondamentale nello sviluppo precoce dell'embrione (Silva et al., 2009) mentre la sua espressione incontrollata è stata strettamente associata con l'insorgenza dei tumori (Iv Santaliz-Ruiz et al., 2014). L'espressione di questo marcatore è riportata in alcuni lavori sulle MSC isolate da vari tessuti extra-fetali (Barboni et al., 2014).

Il gene *telomerase reverse transcriptase (TERT)* rappresenta un componente chiave nel mantenimento della lunghezza dei telomeri, il cui accorciamento è alla base dei fenomeni di

senescenza che conducono alla morte cellulare a seguito di ripetute divisioni. L'espressione di TERT origina diversi prodotti proteici con attività telomerasica, costantemente attivi nelle ESC e responsabili del mantenimento della loro immortalità (Hiyama and Hiyama, 2007).

Geni di differenziamento tessuto specifico

Differenziamento adiposo

Il gene *lipoprotein lipase (LPL)* è coinvolto nel metabolismo degli acidi grassi e diventa trascrizionalmente attivo durante il differenziamento dei pre-adipociti, andando incontro ad un aumento dei livelli di mRNA che raggiunge un valore stabile quando le cellule hanno completato la maturazione in adipociti (Enerback et al., 1992). Il trascritto di LPL è spesso impiegato come marcatore della linea adipogenica e la sua espressione è stata rilevata a seguito di induzione *in vitro* nelle WJC di cane (Seo et al., 2012), nelle AEC ovine (Barboni et al., 2014) e nelle AEC umane (Fatimah et al., 2010). Il gene *peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG)* codifica per un fattore di trascrizione appartenente ad una superfamiglia di recettori attivati da ligando e svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'adipocita, nel quale è espresso selettivamente durante lo stadio iniziale del processo di differenziamento, tanto che la sua induzione è stata dimostrata come condizione necessaria e sufficiente perché avvenga la maturazione (Tontonoz et al., 1994), (Lefterova and Lazar, 2009). L'espressione del trascritto PPARG è stata rinvenuta nelle MSC ovine prelevate dal sangue periferico (Lyahyai et al., 2012) e dal midollo osseo (McCarty et al., 2009) a seguito di induzione al differenziamento.

Differenziamento osseo

Il gene *collagen type I alpha 1 chain (COL1A1)* è considerato un marcatore precoce delle cellule osteoprogenitrici in quanto il suo prodotto proteico costituisce il componente principale della matrice ossea extracellulare (Hing, 2004). Come marcatore osteogenico è stato rinvenuto nelle WJC di cane (Seo et al., 2012) e nelle MSC ovine estratte da tessuti quali midollo osseo (McCarty et al., 2009), (Czernik et al., 2013), sangue (Lyahyai et al., 2012), fegato e tessuto adiposo (Heidari et al., 2013). Il gene *osteocalcin (OCN)*, talvolta indicato anche come *bone gamma-carboxyglutamate protein (BGLAP)*, codifica per una proteina della matrice ossea contenente acido gamma carbossiglutammico che è secreta durante la maturazione osteogenica. Per tale motivo il suo trascritto è spesso impiegato come marcatore di conferma

dell'avvenuto differenziamento nelle MSC, come riportato nelle cellule epiteliali amniotiche ovine (oAEC) (Barboni et al., 2014). La letteratura è concorde nell'affermare che durante l'induzione al differenziamento i marcatori osteogenici vanno incontro ad un'espressione dinamica, con variazioni dei livelli del trascritto tra le fasi precoci e tardive. Tuttavia, mentre *COL1A1* è identificato generalmente un marcatore delle fasi precoci di differenziamento, il marcatore *OCN* è considerato da qualcuno un marcatore delle fasi iniziali del differenziamento osteogenico delle MSC (Nakamura et al., 2009), mentre altri autori lo identificano come un marcatore della fase tardiva legata ai depositi di calcio e fosfato (Birmingham et al., 2012) (Kollmer et al., 2013), e altri ancora hanno evidenziato che i suoi livelli di espressione sono risultati significativamente più alti rispetto ai controlli non indotti a seguito di un periodo di induzione non inferiore ai 21 giorni (Wang et al., 2015).

Differenziamento nervoso

I geni *neurofilament medium (NEFM)* e *neurofilament light (NEFL)* codificano rispettivamente per le catene medie e leggere delle proteine che compongono i neurofilamenti propri dell'assone delle cellule neuronali. In quanto tali sono impiegati come marcatori del differenziamento neurogenico delle MSC (Lyahyai et al., 2012), (Barboni et al., 2014), (Mediano et al., 2015).

1.6 Il modello ovino

Il modello ovino è risultato un valido modello in vari settori biomedici, sia in campo umano sia animale. Il successo della metodica del SCNT è stato conseguito impiegando come modello animale una pecora di razza Finn Dorset (Wilmut et al., 1997). Il modello ovino è stato impiegato nella ricerca medica in diversi settori ed in particolare i tessuti e le cellule crioconservate hanno permesso di ampliare le conoscenze nel settore riproduttivo (Succu et al., 2008), ortopedico (Jager et al., 2011), (Forriol et al., 2011), cardiaco (Hlubocky et al., 2011) e respiratorio (Marcinkiewicz et al., 2016).

2 Scopo del lavoro e disegno sperimentale

Il lavoro svolto durante i tre anni di dottorato si è posto l'obiettivo di analizzare la tematica della crioconservazione attraverso l'esame degli eventi fisici e biologici collegati al processo di preservazione.

L'argomento è stato sviluppato prendendo in esame tre distinte prospettive cellulari al fine di ottenere una panoramica diversificata delle risposte biologiche e delle strategie di conservazione tipo specifiche.

Il primo esperimento, condotto su fibroblasti dermici ovis, è stato volto ad indagare:

- le manifestazioni degli eventi fisici intervenuti durante l'applicazione del profilo termico prescelto, quali l'EIF, l'IIF e le variazioni dei volumi cellulari;
- le risposte biologiche conseguenti all'esposizione al protocollo termico manifestate in termini di sopravvivenza cellulare e di espressione genica di marcatori metabolici, pro e anti apoptotici e di shock termico.

In relazione ai fenomeni fisici, la formazione di ghiaccio nel mezzo extracellulare e gli eventi di darkening (quali diretta ed immediata conseguenza dell'IIF) sono stati monitorati in tempo reale tramite apparecchiatura criomicroscopica su un totale di 14 campioni cellulari (195 cellule) e le relative acquisizioni video sono state impiegate nell'elaborazione della PIIF specifica per il tipo cellulare e le condizioni sperimentali impiegate.

L'esame dei parametri biologici di vitalità ed espressione genica dei fibroblasti crioconservati è stato effettuato ogni 24 ore per tre tempi consecutivi: a seguito del ripristino della temperatura omeostatica (T0), a seguito del mantenimento delle cellule in condizioni di coltura ottimali durante l'intervallo di 24 (T24) e 48 ore (T48) post scongelamento.

Il secondo esperimento è stato condotto con le cellule staminali di origine mesenchimale estratte dalla gelatina di Wharton ovina (oWJC) e ha inteso valutare:

- la presenza delle proprietà di multipotenza e capacità differenziativa nelle cellule isolate dal tessuto cordonale;
- il mantenimento di tali proprietà nelle cellule espanse e crioconservate con tre differenti protocolli di crioconservazione;
- le eventuali variazioni nelle caratteristiche di multipotenza nell'arco delle 48 ore di coltura successive al ripristino della temperatura omeostatica;

- le variazioni nel tasso di sopravvivenza dovute all'applicazione dei tre protocolli di crioconservazione.

I tre protocolli (distinti sulla base delle velocità di raffreddamento, della presenza o meno di un controllo attivo della temperatura e della composizione delle soluzioni di crioconservazione) sono stati denominati come classico (C), lento-controllato (L) e rapido (R). Il possesso delle caratteristiche di multipotenza è stato indagato tramite la valutazione dei livelli di espressione dei marcatori *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* e *TERT*.

La presenza della capacità differenziativa verso le linee adipogenica, osteogenica e neurogenica è stata saggiata tramite le colorazioni istochimiche e l'analisi di marcatori molecolari linea specifici.

Due test di integrità di membrana (Trypan blue ed Hoechst/Ioduro di propidio) sono stati impiegati per valutare i tassi di sopravvivenza cellulare nei campioni crioconservati secondo i tre diversi protocolli, sia nel tempo immediatamente successivo allo scongelamento (T0) sia a seguito delle 48 ore di coltura post scongelamento (T48).

Il terzo esperimento è stato condotto su campioni di seme ovino e costituisce uno studio pilota volto ad effettuare una comparazione tra una procedura convenzionale di congelamento e un protocollo di liofilizzazione parziale. L'attenzione è stata rivolta principalmente agli eventi fisici connessi con i fenomeni di cristallizzazione delle soluzioni crioprotettive e, in seconda battuta, alla valutazione dei parametri biologici di base quali vitalità e motilità cellulare.

Il confronto tra le due tipologie di conservazione è stato condotto impiegando due soluzioni (Lyo A e Lyo B) costituite da sospensioni di seme e mestruai diluitori contenenti trealosio e sorbitolo in differente concentrazione.

Le analisi sono state eseguite con l'impiego di un criomicroscopio e di un microscopio elettronico a scansione al fine di confrontare la struttura dei cristalli di ghiaccio extracellulare e l'ammontare della frazione di soluzione non cristallizzata all'interno della quale vanno a distribuirsi le cellule. Tali fenomeni risultano direttamente connessi con gli eventi di danno meccanico esercitati sugli spermatozoi e con l'efficacia delle procedure di preservazione del gamete maschile.

3 Materiali e metodi

I reagenti utilizzati, dove non altrimenti specificato, sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich Co. LLC.

La concentrazione percentuale è da intendersi volume/volume (v/v %) se non diversamente indicato.

Il termine temperatura ambiente si riferisce ad una temperatura di circa 20 °C.

Gli stock di partenza delle soluzioni di penicillina e streptomina avevano una concentrazione uguale a 5000 U/ml e 5000 mg/ml rispettivamente.

La soluzione madre di glutammina aveva una concentrazione di 200 mM.

La lettera P seguita da un numero arabo indica il numero dei passaggi in vitro della coltura cellulare.

3.1 Esperimento 1 (fibroblasti dermici)

3.1.1 Isolamento cellulare e coltura

La coltura primaria di fibroblasti dermici è stata allestita isolando le cellule del tessuto connettivo da biopsie auricolari prelevate da pecore di razza Sarda adulte, abbattute regolarmente presso uno stabilimento di macellazione locale. La parte anatomica è stata trasportata e manipolata nel laboratorio entro 3 ore dal prelievo, lavata sotto un getto di acqua corrente e in etanolo 70 %, al fine di allontanare l'eccesso di sporcizia del pelo e il sangue eventualmente presente. Le operazioni a seguire sono state effettuate sotto una cappa a flusso laminare verticale. Previo allontanamento dei peli, un frammento dermico di circa 1,5 cm² è stato tagliato e posto in un tubo da 50 ml contenente terreno di raccolta a 37 °C costituito da α -MEM e HEPES (Life Technologies). Il tessuto, trasferito in una piastra Petri sterile, è stato sminuzzato finemente in frammenti di circa 1 mm² e addizionato con 1 ml di siero di pecora in estro al fine di favorire l'adesione dei frammenti nelle piastre di coltura. Queste ultime sono state trasferite in incubatore a 37 °C, 5 % di CO₂ e 100 % di umidità per 30 minuti prima di aggiungere a ciascuna piastra 5 ml di terreno di coltura completo composto da α -MEM, 10 % di FBS (Gibco), 1 % glutammina e 1 % penicillina-streptomina. Il terreno è

stato sostituito dopo 5-7 giorni. Il primo passaggio della coltura è avvenuto al raggiungimento del 80 % di confluenza esponendo il monostrato cellulare ad una soluzione di tripsina (0,25 %) e EDTA (0,04 %). Le cellule sono state espanse fino al quinto passaggio (P5) prima di eseguire gli esperimenti.

3.1.2 Vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata saggiata valutando l'integrità di membrana con il colorante Trypan Blue. Le cellule danneggiate appaiono blu mentre le cellule integre risultano incolori. Il test è stato condotto dopo ogni distacco dalle piastre Petri (nelle cellule non crioconservate e nei campioni di coltura post scongelamento T24 e T48) e dopo lo scongelamento (campioni T0). La soluzione di colorante (0.4 % Trypan blue in PBS, p/v %) è stata diluita in rapporto 1:1 con la sospensione cellulare e un'aliquota di 10 µl è stata sottoposta alla conta in una camera Burker. La percentuale di sopravvivenza è stata ricavata dal rapporto percentuale tra le cellule non colorate e il totale delle cellule presenti nel reticolo.

3.1.3 Immunocitochimica

La presenza di vimentina, un tipico filamento intermedio dei fibroblasti, è stata saggiata nelle cellule a P5 al fine di valutare l'omogeneità della popolazione cellulare isolata. Le cellule adese sono state lavate per 3 volte in una soluzione costituita da PBS e Triton 0,1 %, quindi fissate in metanolo assoluto (4 °C) e infine esposte per 1 ora alla soluzione di permeabilizzazione (PBS, Triton 0,1 %, BSA 3 %). L'anticorpo primario anti-vimentina (M 0725; DakoCytomation) è stato mantenuto in incubazione a 4 °C per una notte (diluizione 1:300 in soluzione di permeabilizzazione) mentre l'esposizione all'anticorpo secondario appropriato (AlexaFluor 488; Life Technologies) è stata protratta per 1 ora. I nuclei sono stati colorati esponendo il campione per 15 minuti ad una soluzione di blu di Hoechst (2 µg/ml).

3.1.4 Curva di crescita cellulare

La curva di crescita è stata allestita piastrando 2×10^3 cellule/pozzetto in multipiastre da 24 pozzetti (Nunc). La conta è stata effettuata in camera Burker. La vitalità cellulare è stata determinata con il colorante Trypan blue sia nelle cellule di controllo non crioconservate sia nei campioni crioconservati. Le colture sono state monitorate per un totale di 120 ore.

3.1.5 Preparazione dei campioni

Allo scopo di ottenere una sospensione di cellule singole, le piastre di coltura a P5, confluenti per il 90 % della superficie, sono state manipolate secondo i seguenti passaggi:

- allontanamento del terreno esausto;
- lavaggio con PBS $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ free;
- distacco cellulare con una soluzione di tripsina (0,25 %) - EDTA (0,04 %);
- centrifugazione per 4 minuti a $235 \times g$;
- risospensione del pellet in terreno di coltura completo.

Dopo la conta in camera Burker, le cellule in sospensione sono state nuovamente centrifugate per 2 minuti, quindi risospese nel terreno di crioconservazione (medium crio) così composto: 50 % α -MEM, 40 % FBS, 10 % DMSO. Prima di sottoporre i campioni a crioconservazione, la fase di equilibratura con l'agente crioprotettore è stata protratta per 15 minuti a temperatura ambiente.

3.1.6 Crioconservazione

Gli esperimenti di crioconservazione sono stati condotti impiegando due sistemi di congelamento a velocità controllata:

- un criomicroscopio (CM) equipaggiato con lo stage BCS196 (Linkam, Tadworth, United Kingdom);
- una Criocamera (CC) programmabile adatta alla crioconservazione in paillettes (CryoBath, Cryo Logic, Mount Waverley, AU).

In accordo con gli intervalli operativi dei due sistemi, entrambi gli strumenti sono stati programmati per l'esecuzione di un medesimo profilo termico. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in assenza di seeding e la nucleazione del ghiaccio è avvenuta spontaneamente. Tramite il CM sono state esaminate la IIF e le eventuali variazioni del volume cellulare, mentre i campioni crioconservati con il CC sono stati raccolti per le analisi di espressione genica. Al termine della crioconservazione è stata valutata la vitalità al tempo zero (T0) post scongelamento.

3.1.6.1 Studi di criomicroscopia

Il criomicroscopio (Figura 3.1) si compone di un sistema di controllo automatizzato della temperatura (PE95/T95), di una stazione d'immagine equipaggiata di obiettivi e telecamera, di un software di controllo (Linksys32) e della camera di crioconservazione (stage BCS196). L'intervallo di temperatura programmabile varia da +125 °C a -196 °C, mentre i valori della velocità di raffreddamento/ riscaldamento sono compresi nell'intervallo da 150 °C/min a 0.01 °C/min.

In fase preparatoria è stato realizzato un sottile film di sospensione cellulare depositando una goccia del liquido (0.005ml X [2.4 X 10⁶/ml]) al centro di una piccola piastra di quarzo e apponendovi sopra, con estrema delicatezza, un vetro circolare di 13 mm di Ø. Il campione così preparato è stato alloggiato all'interno dello stage sulla superficie del blocco d'argento preposto agli scambi termici. Per evitare che la formazione di condensa ostacolasse l'acquisizione delle immagini, lo stage è stato saturato con azoto gassoso e l'aria è stata espulsa dalle valvole. La raccolta delle immagini e il monitoraggio in tempo reale sono stati compiuti tramite una telecamera Qimaging (Qicam fast 1394 CCD), usando un obiettivo con lenti 20 X.



Figura 3.1: Sistema di criomicroscopia costituito da: stazione d'immagine (A), stage BCS196 (B), serbatoio per azoto liquido (C), sistema di controllo automatizzato della temperatura PE95/T95 (D), interfaccia di controllo touch-screen (E).

Il profilo termico è stato programmato, a partire da un valore di temperatura ambiente, in 4 rampe:

- a. raffreddamento alla velocità di 5 °C/min sino al limite di -4 °C e mantenimento della temperatura per 3 minuti;
- b. raffreddamento a 5 °C/min sino al limite di -120 °C ;
- c. aumento della velocità di raffreddamento a 150 °C/min sino al raggiungimento di -196 °C e mantenimento del campione a questo valore per 10 minuti;
- d. riscaldamento del campione alla velocità di 150 °C/min sino a 20 °C .

In totale sono stati eseguiti 14 esperimenti e 195 cellule sono state selezionate per le analisi. Le immagini per lo studio della IIF sono registrati alla frequenza di 1 fps tra -4 °C e -35 °C , intervallo di temperature entro il quale era attesa la formazione del EIF. L'analisi dei dati video è stata eseguita individuando in ciascun fotogramma il numero e la dimensione delle cellule nelle quali si verificava un improvviso oscuramento del corpo cellulare (darkening). La probabilità di formazione del ghiaccio intracellulare (PIIF) è stata calcolata come il rapporto tra il numero totale di cellule che hanno manifestato il darkening sul totale delle cellule del campione.

I valori del volume cellulare sono stati rilevati prima che intervenisse la formazione del ghiaccio, prendendo in considerazione singoli fotogrammi corrispondenti a determinati valori di temperatura: +15 °C, +4 °C, 0 °C, -4 °C, -10 °C, e -20 °C. Sono state prese in esame esclusivamente le cellule statiche in possesso di una forma sferica. Impiegando lo strumento di misura del software Linksys32, sono state acquisite le misure dei diametri perpendicolari delle cellule selezionate e il volume cellulare è stato calcolato secondo la formula $V=4/3 \pi r^3$.

3.1.6.2 Studi con il sistema Criocamera

Il sistema impiegato nell'esperimento consta di un serbatoio di azoto liquido, di una criocamera entro la quale alloggiare le paillettes dei campioni, di un sistema di controllo della temperatura (il CL8000) ed di un interfaccia utente (il software CryoGenesis, V5). Le variazioni di temperatura programmabili sono comprese nell'intervallo tra +40 °C e -120 °C.

La sospensione cellulare è stata diluita nella soluzione di crioconservazione (0,21 ml x [1 x 10⁶/ml]) e caricata nelle paillettes. Il profilo termico è stato costruito in 4 rampe partendo dalla temperatura di 20 °C:

- a. raffreddamento a 10 °C/min sino alla temperatura di -4 °C e mantenimento della temperatura per 3 minuti;
- b. raffreddamento a 5 °C/min sino al limite di -120 °C;
- c. immersione immediata delle paillettes in azoto liquido per 10 minuti;
- d. riscaldamento in bagno termostato a 37 °C sino alla completa fusione e scomparsa del ghiaccio.

La nucleazione del ghiaccio si è verificata spontaneamente senza induzione esterna. Dopo riscaldamento, il crioprotettore è stato rimosso da ciascuna paillette diluendo il suo contenuto in terreno di coltura (1:9 v/v, 37 °C per 15 minuti). Ogni diluizione è stata divisa in due aliquote: la prima è stata centrifugata immediatamente a 170 x g per 4 minuti e il pellet è stato conservato nel appropriato tampone a -80 °C in vista delle successive analisi molecolari; la seconda aliquota è stata utilizzata per allestire le colture in vitro da protrarre per 24 e 48 ore prima di raccogliere le cellule per le successive analisi molecolari.

3.1.7 Analisi dell'espressione genica

I campioni di RNA sono stati isolati a partire dai campioni di fibroblasti dermici crioconservati con la CC e nei campioni coltivati in vitro a seguito della crioconservazione. I gruppi sperimentali sono i seguenti:

- T0 CTR: fibroblasti di controllo post-distacco (non crioconservati);
- T0 CRYO: fibroblasti crioconservati, analizzati immediatamente dopo il riscaldamento;
- T24 CTR: fibroblasti di controllo post-distacco coltivati in vitro per 24 ore (non crioconservati);
- T24 CRYO: fibroblasti crioconservati, analizzati dopo 24 ore di coltura in vitro;
- T48 CTR: fibroblasti di controllo post-distacco coltivati in vitro per 48 ore (non crioconservati);
- T48 CRYO: fibroblasti crioconservati, analizzati dopo 48 ore di coltura in vitro.

Le cellule ($\sim 5 \times 10^5$) sono state conservate nel tampone RLT (RNeasy Micro Kit; Qiagen, Hilden, Germany) alla temperatura di -80°C sino al momento delle analisi. Sono stati presi in esame tre replicati per ciascun gruppo.

3.1.7.1 *Isolamento del RNA e trascrizione inversa*

L'RNA totale è stato isolato utilizzando il kit RNeasy Micro Kit (Qiagen) e seguendo le istruzioni riportate dal produttore. Prima dell'estrazione dell'RNA, ciascun campione è stato addizionato con 5 pg di mRNA di luciferasi (Promega) al fine di stimare la perdita di RNA durante il processo di estrazione. Durante la procedura, l'RNA è stato trattato con DNasi I per eliminare qualsiasi possibile contaminazione di DNA genomico. L'RNA è stato quantificato mediante lo spettrofotometro NanoDropLite (Fisher Scientific S.A.S.). Per la sintesi del DNA complementare (cDNA) sono stati utilizzati 40 ng di RNA che sono stati sottoposti a trascrizione inversa. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 20 µl, composti da:

- 50 mM Tris-HCl (pH 8.3),
- 75 mM KCl,
- 3 mM MgCl₂,
- 5 mM DTT,
- 1 mM dNTPs,
- 2.5 mM random hexamer primers,
- 0.05 mg oligo (dT)18 primers,
- 20 U RNase OUT,
- 100 U SuperScript III RT

(Tutti i reagenti sono stati acquistati dalla Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

I tubi di reazione sono stati incubati a 25 °C per 10 minuti, poi a 42 °C per 1 ora e infine a 70 °C per 15 minuti così da inattivare la reazione. Come controlli negativi sono stati analizzati anche due tubi: un tubo senza RNA; uno con RNA ma in assenza dell'enzima retrotrascrittasi. Allo scopo di quantificare il tasso di recupero dell'RNA, anche 5 pg di mRNA di luciferasi (non soggetti all'isolamento dell'RNA) sono stati sottoposti alla sintesi di cDNA.

3.1.7.2 *Reazione a catena della polimerasi in tempo reale: Real Time PCR*

I primers per tutti i geni studiati sono elencati nella Tabella 3.1. La quantificazione relativa dei trascritti è stata eseguita tramite Real Time PCR con lo strumento 7900HT Real-Time PCR

System (Applied Biosystems, Foster City, CA). La PCR è avvenuta in un volume di reazione di 15 µl contenenti 7.5 µl di 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM di ciascun primer e il cDNA equivalente a 5 ng di RNA.

Il protocollo di PCR consisteva in due fasi di incubazione (50 °C per 5 minuti e 95 °C per 2 minuti), seguiti da 40 cicli del programma di amplificazione (95 °C per 15 secondi, temperatura di appaiamento gene-specifica (Tabella 3.1) per 30 secondi, e 72 °C per 30 secondi), un programma per la curva di melting (65 °C–95 °C, inizio dell'acquisizione della fluorescenza a 65 °C e raccolta delle misure ad intervalli di 10 secondi sino al raggiungimento della temperatura di 95 °C), e infine una tappa di raffreddamento a 4 °C. I dati di fluorescenza sono stati acquisiti durante le tappe di estensione a 72 °C. Per minimizzare le variazioni dovute alle manipolazioni, tutti i campioni da comparare sono stati inseriti nella medesima corsa di reazione usando una master mix di PCR contenente tutti i componenti di reazione eccetto il campione. La dimensione dei prodotti della Real Time PCR è stata confermata dall'elettroforesi in gel di agarosio al 2 % colorato con Sybr Safe (Invitrogen Corporation) e reso visibile tramite l'esposizione alla luce blu di un transilluminatore. I prodotti di PCR sono stati sequenziati (Model 3130xl Genetic Analyzer; Applied Biosystems) dopo la purificazione con il MinElute PCR purification kit (Qiagen) e l'identità delle sequenze è stata confermata con BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). La quantificazione relativa dell'espressione genica è stata eseguita con il metodo 2-ddCq (Livak and Schmittgen, 2001). L'analisi dell'espressione è stata condotta normalizzando ciascun gene target contro la media di 4 geni di riferimento interni (*succinate dehydrogenase complex subunit A* [SDHA], *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta* [YWHAZ], *ribosomal protein L9* [RPL9], and *actin B* [ACTB]). Prima della normalizzazione è stata verificata l'espressione stabile dei geni riferimento in tutti i gruppi in esame.

Tabella 3.1. Descrizione dei primers utilizzati negli esperimenti di Real Time PCR dei fibroblasti.

Gene	Gene name	Accession number	Primers sequence	Ta	Size (bps)
<i>ACTB</i>	Actin B	NM_001009784	5' ttcttggtatggatcctg 3' 5' ggtgatctccttctgcatcc 3'	60°C	162
<i>BAX</i>	BCL2-associated X Protein	XM_004015363	5' aacatggagctgcagaggat 3' 5' ggacattggacttccttctga 3'	58°C	219
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/ lymphoma 2	XM_004020687	5' tggagatcaaccctgacca 3' 5' gggatcctcaagcgagaag 3'	58°C	145
<i>CIRBP</i>	Cold inducible RNA binding protein	XM_004008776	5' gagggctgagttttgacacc 3' 5' atgggaagtctgtggatggg 3'	58°C	190
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehide-3- Phosphate	NM_001190390	5' atgctcctgcaccacca 3' 5' agtccctccacgatgcca 3'	58°C	136
<i>HSP90b</i>	Heat shock protein 90b	AB072369	5' tggagatcaaccctgacca 3' 5' gggatcctcaagcgagaag 3'	58°C	143
<i>KIF11</i>	Kinesin family member 11	XM_004020034	5' tgatcttgaggcagtgaga 3' 5' ccctctgactctgggaagg 3'	62°C	100
<i>POU5F1 (OCT4)</i>	POU domain, class 5, transcription factor 1	XM_012101009	5' gaggagtcccaggacatcaa 3' 5' ccgagcttacacatgttct 3'	56°C	204
<i>RPL9</i>	Ribosomal protein L9	XM_004012836	5' caactcccgcagcagat 3' 5' ccgggaatggacagtcaca 3'	56°C	127
<i>SDHA</i>	Succinate Dehydrogenase	XM_012125144	5' catccactacatgacggagca 3' 5' atcttgccatctcagttctgcta 3'	60°C	90
<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase 1	NM_001145185	5' ggcaatgtgaaggctgacaa 3' 5' aagaccagatgactgggca 3'	58°C	130
<i>YWHAZ</i>	Tyrosine 3- Monooxygenase	NM_001267887	5' ttagtagcccgtaggtcatct 3' 5' ttctctgtattctcgagccatct 3'	60°C	168

3.1.8 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con il pacchetto software MINITAB Release 12.1 (Minitab, Inc., State College, PA). I dati di vitalità sono stati esaminati con l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dalle comparazioni di Tukey *post-hoc*. Dopo aver testato la normalità e l'omogeneità delle

varianze usando rispettivamente i test di Kolmogorov–Smirnov e Levene, i dati dei trascritti sono stati analizzati con il modello lineare generale ANOVA, seguito dalle comparazioni di Tukey post-hoc quando i valori p erano significativamente diversi. Le differenze sono state considerate significative quando $p < 0.05$.

3.2 Esperimento 2 (cellule della gelatina di Wharton)

3.2.1 Isolamento cellulare e coltura

I campioni di cellule derivate dalla gelatina di Wharton sono stati ottenuti a partire da quattro cordoni ombelicali prelevati da agnelli nati al completamento della gestazione (Figura 3.2). Il parto cesareo è stato eseguito presso le strutture del Dipartimento di Medicina Veterinaria a seguito delle necessarie autorizzazioni ottenute dal comitato etico competente. Ciascun cordone è stato trasportato dalla sala parto al laboratorio immerso in una soluzione di PBS a 38,5°C e manipolato entro mezz'ora dal prelievo. Sotto una cappa a flusso laminare verticale il cordone è stato disteso su un telo chirurgico sterile, i quattro vasi sanguigni sono stati rimossi e il tessuto è stato inciso longitudinalmente al fine di esporre la parte interna. La gelatina di Wharton, di colore bianco lattiginoso, è stata separata dall'epitelio amniotico con l'ausilio di pinze, pesata e sminuzzata finemente. A seguire, la digestione enzimatica è stata condotta in una soluzione di collagenasi (tipo IV) allo 0,1 % in presenza di CaCl_2 per 3 ore a 38,5 °C. I detriti residuati dalla digestione sono stati allontanati filtrando la soluzione con membrane da 70 μm di diametro ed eseguendo alcuni lavaggi tramite centrifugazione per 10 minuti a 235 x g in presenza di PBS. La sospensione monocellulare è stata sottoposta a conta in camera Burkner al fine di mettere in relazione la massa del tessuto digerito con la resa cellulare. La vitalità è stata valutata con il colorante Trypan blue. La coltura primaria è stata allestita piastrando le cellule in fiasche T25 con una densità di semina di 1×10^5 cellule/cm² in terreno di coltura costituito da HG-DMEM, 10 % FBS, 1 % glutammina, 1 % penicillina-streptomina e 10 ng/ml EGF. Il terreno è stato sostituito dopo 24 ore per allontanare le cellule non adese e i detriti eventualmente presenti. Le cellule sono state distaccate con una soluzione di tripsina (0,25 %) e EDTA (0,04 %) al raggiungimento del 80 % di confluenza, quindi riseminate ad una densità di 1×10^4 /ml e mantenute a 38,5 °C, 5 % CO₂ e 100 % umidità per i passaggi successivi.

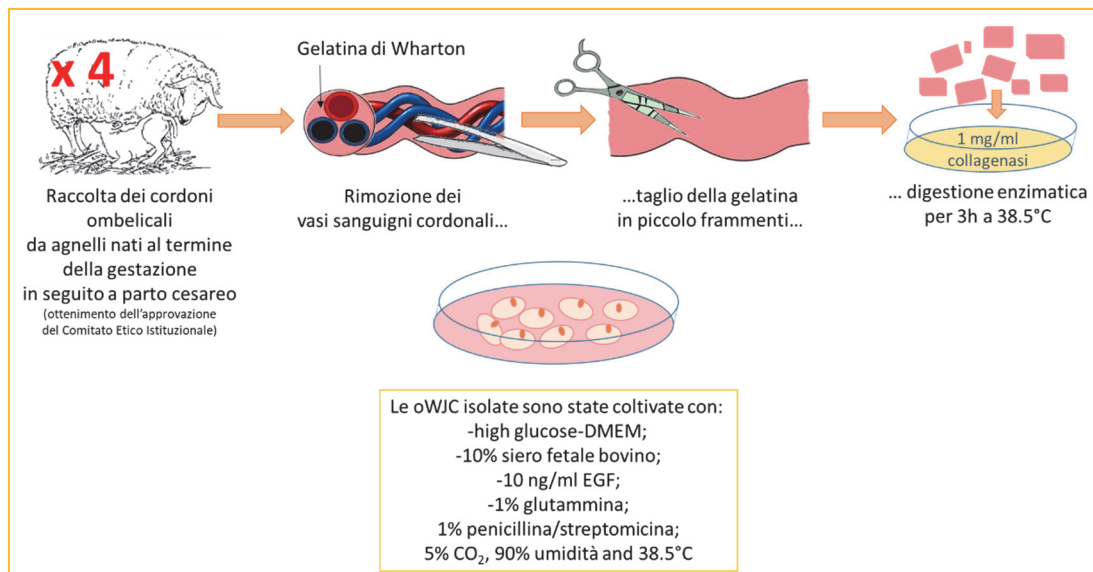


Figura 3.2. Schema delle fasi procedurali condotte per l'allestimento della coltura primaria di cellule mesenchimali della gelatina di Wharton.

3.2.2 Vitalità cellulare

La valutazione della vitalità cellulare è stata eseguita nei campioni di controllo freschi non crioconservati, nei campioni equilibrati nelle soluzioni crioprotettive e nei campioni T0 e T48 ricoltivati dopo scongelamento. Allo scopo sono state impiegate la colorazione di Trypan blue e la colorazione in fluorescenza con Hoechst/Ioduro di propidio.

In breve, la conta vitale con il Trypan blue (0,4 %, p/v) è stata condotta in camera Burkler pipettando 10 µl di sospensione cellulare diluita in rapporto 1:1 con il colorante. Sono state considerate vitali le cellule incolori e non vitali le cellule colorate.

La colorazione con i coloranti fluorescenti blu di Hoechst (2 µg/ml) e Ioduro di propidio (1 µg/ml) è stata eseguita tenendo in incubazione le sospensioni cellulari per 15 minuti a 38,5 °C. La conta delle cellule marcate è stata eseguita tramite un microscopio a fluorescenza (Olympus BX71). La percentuale di vitalità è stata calcolata come la frazione complementare del rapporto tra le cellule colorate dallo Ioduro di propidio e il totale delle cellule colorate dall'Hoechst.

3.2.3 Proliferazione cellulare

Il saggio per valutare le unità formanti colonie (CFU) è stato allestito a partire dalle cellule a P1, seminate con HG-DMEM in piastre da 6 pozzetti secondo diverse densità (100, 250, 500, 1000 cellule/cm²). Le cellule sono state lasciate in coltura per due settimane. Le colonie sono state fissate per 1 ora in formalina al 4 % e colorate con blu di metilene 1 % per 15 minuti in tampone borato 10 mM a temperatura ambiente. Per la conta sono state selezionate le colonie costituite da 16-20 cellule.

Le curve di crescita sono state realizzate a P1, P5 e P10. Le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti alla densità di 1×10^3 /cm². La conta è stata eseguita in camera Burker ogni due giorni per 14 giorni, staccando con tripsina uno dei sei pozzetti seminati e colorando le cellule con il Trypan blu.

Il tempo di duplicazione della popolazione (PDT) da P1 a P10 è stato valutato seminando 1×10^3 cellule/cm² in piastre da 6 pozzetti e tripsinizando, contando e riseminando le cellule ogni 3/4 giorni alla densità di partenza. Il valore medio di PDT è stato calcolato sulla base dei valori ottenuti nei 10 passaggi. Per ciascun passaggio, il PDT è stato calcolato in accordo con la formula $CT/((\log(N_f/N_i)/\log 2)$ dove:

- CT= tempo in coltura (in giorni);
- N_f= numero delle cellule al momento della conta;
- N_i= numero di cellule seminate nel pozzetto.

3.2.4 Crioconservazione

Tre differenti protocolli sono stati impiegati per la crioconservazione delle cellule isolate dalla gelatina di Wharton. Essi sono distinti secondo le caratteristiche di velocità di raffreddamento e sono stati identificati come segue:

- protocollo classico (C): caratterizzato da una discesa termica non controllata realizzata mediante l'esposizione del campione a temperature progressivamente decrescenti;

- protocollo lento-controllato (L): realizzato applicando un controllo puntuale della discesa termica attraverso un sistema computerizzato in grado di eseguire una precisa velocità di raffreddamento;
- protocollo rapido (R): realizzato per immersione diretta del campione in azoto liquido.

I dispositivi di alloggiamento del campione, comuni ai tre protocolli, erano rappresentati da paillettes di volume pari a 250 μ l. Per ciascun protocollo sono state allestite 6 paillette, di cui:

- #3 da destinare alle analisi della capacità differenziativa post scongelamento;
- #2 per le analisi di espressione genica;
- #1 per le analisi della vitalità al tempo zero (T0) e per la ricoltura post scongelamento.

3.2.4.1 Preparazione dei campioni

Le colture cellulari, espanse sino a P6 al fine di ottenere un numero sufficiente di cellule da saggiare, sono state manipolate per ottenere una sospensione di cellule singole. I passaggi sono descritti di seguito:

- allontanamento del terreno di coltura esausto;
- lavaggio in PBS privo di $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$;
- incubazione della sospensione cellulare a 38,5 °C in una soluzione di tripsina-EDTA (0,25 %-0,04 %) per 5 minuti;
- neutralizzazione della tripsina per aggiunta di terreno completo;
- centrifugazione per 4 minuti a 235 x g;
- sospensione del pellet in 1 ml terreno completo;
- conta vitale di un'aliquota di campione in camera Burkler;
- centrifugazione del campione di partenza per 4 minuti a 235 x g;
- sospensione del pellet cellulare in un volume variabile di terreno completo.

Il volume di terreno è stato definito in funzione della conta cellulare, tenendo in considerazione le successive diluizioni nelle soluzioni di crioprotezione, al fine di ottenere una concentrazione nella sospensione finale di 2×10^6 cellule/ml. Sono stati allestiti 3 gruppi

distinti, le cui cellule sono state manipolate secondo le specifiche del profilo termico di appartenenza.

3.2.4.2 Soluzioni di crioconservazione e tempi di equilibratura

L'equilibratura dei campioni cellulari nelle soluzioni di crioprotezione è stata condotta seguendo una procedura graduale di esposizione a concentrazioni crescenti di CPA.

Sono stati preparati due gruppi di soluzioni: soluzioni per il congelamento lento (Slow solutions) e soluzioni per il congelamento rapido (Fast solutions). Le prime sono state impiegate nella preparazione dei campioni per i protocolli classico (C) e lento controllato (L); le seconde durante i passaggi di equilibratura del protocollo rapido (R). Composizione e passaggi sono descritti brevemente di seguito.

Slow solutions:

- soluzione D5: HG-DMEM, 40 % FBS, 0,1 % PVA, 1 % penicillina-streptomicina, 1 % glutammina, 25 mM HEPES, 5 % DMSO;
- soluzione D10: HG-DMEM, 40 % FBS, 0,1 % PVA, 1 % penicillina-streptomicina, 1 % glutammina, 25 mM HEPES, 10 % DMSO.

Passaggi di equilibratura nelle Slow solutions:

- sospensione cellulare + D5 (rapporto 1:1) = una nuova sospensione di volume doppio (V2) con CPA al 2,5 %;
- sospensione V2 + D10 (rapporto 1:1) = soluzione V3 con CPA al 7,5 %;
- sospensione V3 + D10 (rapporto 1:2) = soluzione finale con CPA al 10,8 %.

Il tempo di equilibratura di ciascun passaggio è stato protratto per 30 secondi, spipettando delicatamente tra uno e l'altro per favorire una distribuzione uniforme tra cellule e CPA. Le cellule nella soluzione finale (2×10^6 /ml) sono state caricate nelle paillettes (200 µl/paillette) e mantenute a temperatura ambiente per 10 minuti prima dell'avvio della discesa termica.

Fast solutions:

- soluzione EQ1: HG-DMEM, 20 % FBS, 0,1 % PVA, 1 % penicillina-streptomicina, 1 % glutammina, 25 mM Hepes, 7,5 % DMSO, 7,5% EG;
- soluzione EQ2: HG-DMEM, 20 % FBS, 0,1 % PVA, 1 % penicillina-streptomicina, 1 % glutammina, 25 mM Hepes, 5 % DMSO, 5 % EG;
- soluzione VS: HG-DMEM, 20 % FBS, 0,1 % PVA, 1 % penicillina-streptomicina, 1 % glutammina, 25 mM Hepes, 15 % DMSO, 15 % EG.

Passaggi di equilibratura nelle Fast solutions:

- sospensione cellule + EQ1 (rapporto 1:1) = volume V1 con 3,75 % di DMSO e 3,75 % di EG (equilibratura 90 sec);
- volume V1 + EQ1 (in rapporto 2:1) = soluzione V2 con 6,25 % di DMSO e 6,25 % di EG (equilibratura 90 sec);
- V2 + EQ2 (rapporto 3:1) = volume V3 nel quale DMSO e EG si trovavano ad una concentrazione pari al 7,5 % (equilibratura 2 min);
- volume V3 + VS (1:2) = sospensione cellulare finale avente il 15 % di DMSO e il 15 % di EG (equilibratura 40 secondi).

Durante l'ultimo passaggio, la sospensione è stata caricata nella paillette e manipolata immediatamente per la discesa termica.

3.2.4.3 Protocollo classico (C)

Il campione cellulare è stato crioconservato seguendo una riduzione termica non controllata, realizzata mediante l'esposizione del campione a temperature progressivamente decrescenti. Le paillettes sono state tenute 1 ora a 4 °C, 2 ore a -20 °C, una notte a -80 °C e, successivamente, immerse in azoto liquido (-196 °C). I campioni sono stati mantenuti a temperature criogeniche per un periodo di 20/30 giorni.

3.2.4.4 Protocollo lento-controllato (L)

Il protocollo di crioconservazione è stato realizzato applicando un controllo puntuale della velocità di raffreddamento tramite l'impiego del sistema computerizzato CryoLogic. Nel software di programmazione (CryoGenesis) è stata disegnata una discesa termica costituita da un'unica rampa nella quale la velocità di raffreddamento era costante e pari a 1 °C/min. Le paillettes contenenti il campione sono state alloggiare nella camera di crioconservazione e la discesa termica controllata è stata protratta sino alla temperatura limite dello strumento (-120 °C). Il campione è stato quindi prelevato dalla camera di crioconservazione, immerso rapidamente in azoto liquido (-196 °C) e mantenuto a temperature criogeniche per un periodo di 20/30 giorni.

3.2.4.5 Protocollo rapido (R)

La discesa termica dei campioni è stata rapida e incontrollata. Le paillettes, caricate con la sospensione cellulare equilibrata, sono state immerse direttamente in azoto liquido (-196 °C) e mantenute a temperature criogeniche per un periodo di 20/30 giorni.

3.2.5 Scongelamento

Lo scongelamento è stato realizzato tramite immersione delle paillettes in un bagno termostato a 38,5 °C fino alla scomparsa del ghiaccio. Il crioprotettore è stato rimosso da ciascuna paillette diluendo il suo contenuto in terreno di coltura completo (1:9 v/v, 38,5 °C) e centrifugando 10 minuti a 235 x g. Il pellet ricavato è stato risospeso come segue:

- in terreno di coltura completo per i campioni destinati alla contra vitale post scongelamento (T0) e alla ricoltura per ulteriori 48 ore (T48);
- in terreno di coltura completo nei campioni destinati all'analisi della capacità differenziativa post scongelamento;
- in buffer RLT per le cellule destinate alle analisi di espressione genica del tempo zero (T0).

3.2.6 Conta vitale e coltura post crioconservazione

La conta vitale al tempo zero (T0) è stata eseguita su un'aliquota della sospensione cellulare secondo le due metodiche descritte nel paragrafo 3.2.2.

La coltura post scongelamento è stata allestita seminando $1,8 \times 10^5$ cellule in due distinte fiasche T25 con terreno di coltura completo e incubando a 38,5 °C, 5 % CO₂ e 100 % umidità. Le fiasche sono state mantenute in coltura per 48 ore.

Al termine del periodo di coltura, le cellule sono state distaccate con una soluzione di tripsina-EDTA e un'aliquota è stata destinata per la valutazione della vitalità tramite le colorazioni Trypan blue ed Hoechst/Ioduro di propidio. La restante parte è stata centrifugata, risospesa nel tampone RLT e conservata a -80 °C per le analisi molecolari.

3.2.7 Differenziamenti cellulari

I saggi di differenziamento sono stati condotti sulle cellule isolate dalla gelatina di Wharton a P1 e sulle cellule crioconservate secondo i protocolli classico e lento-controllato.

Il differenziamento adipogenico è stato realizzato seminando 28×10^3 cellule/ pozzetto in multipiastre da 6 pozzetti. Verificata l'avvenuta adesione cellulare al supporto, il mezzo di coltura è stato sostituito alternando ogni 3 giorni il terreno di induzione con il terreno di mantenimento, per un totale di 21 giorni.

Il terreno di induzione era composto da:

- HG-DMEM;
- 10 % FBS;
- 2 % penicillina- streptomina;
- 0,25 µg/ml amfotericina B;
- 200 mM glutamina;
- 0,1 % insulina;
- 0,1 µM desametasone;
- 1 % indometacina.

Il terreno di mantenimento era costituito da:

- HG-DMEM;
- 10 % FBS;
- 2 % penicillina- streptomina;
- 0,25 µg/ml amfotericina B;
- 0,1 % insulina.

La conferma dell'avvenuto differenziamento adipogenico è stata ricercata tramite la colorazione delle strutture lipidiche con la colorazione di Oil Red O.

Il differenziamento osteogenico è stato realizzato seminando 28×10^3 cellule/ pozzetto in multipiastre da 6 pozzetti. Verificata l'avvenuta adesione cellulare al supporto, il mezzo di coltura è stato rimpiazzato dal terreno di induzione, sostituito ogni 3 giorni per un totale di 21 giorni.

Il terreno di induzione era così composto:

- HG-DMEM;
- 10 % FBS;
- 2 % penicillina- streptomina;
- 0,25 µg/ml amfotericina B;
- 200 mM glutamina;
- 0,25 mM acido ascorbico;
- 10 mM β-glicerofosfato;
- 0,1 µM desametasone.

La conferma dell'avvenuto differenziamento osteogenico è stata ricercata tramite la colorazione della matrice extracellulare di calcio secondo la colorazione di Von Kossa.

Il differenziamento neurogenico è stato realizzato seminando 28×10^3 cellule/ pozzetto in multiplastre da 6 pozzetti. Verificata l'avvenuta adesione cellulare al supporto, è stato somministrato il terreno di preinduzione per 1 giorno, sostituito con il terreno di induzione per i seguenti 7 giorni. Il terreno di preinduzione era composto da:

- HG-DMEM;
- 20 % FBS;
- 2 % penicillina- streptomina;
- 0,25 µg/ml amfotericina B;
- 0,0007 % β-mercaptoetanol.

Il terreno di induzione era costituito da:

- HG-DMEM;
- 2 % FBS;
- 2 % penicillina- streptomina;
- 0,25 µg/ml amfotericina B;
- 1 % DMSO;
- 0,36 mg/ml butilidrossianisolo.

La conferma dell'avvenuto differenziamento neurogenico è stata ricercata tramite la colorazione della sostanza e dei granuli di Nissl con la colorazione di Nissl.

Per ciascun saggio di differenziamento, il gruppo controllo è stato allestito seminando le cellule ad una densità inferiore (9500 cellule/pozzetto) e mantenendo la coltura in terreno standard HG-DMEM. Portati a termine i protocolli di differenziamento, alcune aliquote di cellule non sottoposte a colorazione istologica sono state conservate a -80 °C in tampone RLT per l'esecuzione delle successive analisi molecolari.

3.2.8 Analisi dell'espressione genica

I campioni di RNA sono stati estratti a partire dalle cellule cordonali della gelatina di Wharton, sia di controllo sia sottoposte alle procedure di differenziamento. Secondo la natura del campione, sono stati allestiti due gruppi di analisi:

1. analisi quali/quantitative dei campioni cellulari indifferenziati;
2. analisi qualitative dei campioni cellulari indotti al differenziamento.

L'espressione dei marcatori di pluripotenza (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *TERT*), dei marcatori di superficie delle linee mesenchimale (*CD29*) e emopoietica (*CD34*) e del marker del complesso maggiore di istocompatibilità MCH II (*CD74*) è stata saggiata nelle cellule indifferenziate, sia fresche (P1) sia crioconservate (P6) secondo i tre diversi protocolli termici. Per ciascun protocollo sono state esaminate le cellule raccolte immediatamente dopo lo scongelamento (T0) e le cellule rimesse in coltura per 48 ore (T48). Il gruppo controllo era rappresentato dalle cellule indifferenziate non sottoposte ad alcuna procedura di crioconservazione.

L'espressione dei marcatori di differenziamento delle linee adipogenica (*PPARG*, *LPL*), osteogenica (*OCN*, *COLA1*) e neurogenica (*NEFM*, *NEFL*) è stata valutata nei campioni non differenziati (cellule controllo) e nei campioni indotti ai differenziamenti prima (P1) e dopo crioconservazione (T0). Tessuti di ovino (tessuto adiposo, tessuto osseo e tessuto encefalico) sono stati impiegati come controlli positivi nella valutazione dei markers linea specifici.

Tutti i campioni (circa 5×10^5 /campione) sono stati conservati in RLT buffer (RNeasy Micro Kit; Qiagen, Hilden, Germany) a -80°C sino al momento delle analisi. Sono stati esaminati 2 replicati biologici per ciascuna categoria.

3.2.8.1 Isolamento dell'RNA e trascrizione inversa

L'RNA totale è stato isolato utilizzando il kit RNeasy Micro Kit (Qiagen) e seguendo le istruzioni riportate dal produttore. Prima dell'estrazione dell'RNA, ciascun campione è stato addizionato con 5 pg di mRNA di luciferasi (Promega) al fine di stimare la perdita di RNA durante il processo di estrazione. Durante la procedura, l'RNA è stato trattato con DNasi I per eliminare qualsiasi possibile contaminazione di DNA genomico. L'RNA è stato quantificato mediante lo spettrofotometro NanoDropLite (Fisher Scientific S.A.S.). Per la sintesi del DNA

complementare (cDNA) sono stati utilizzati 470 ng di RNA che sono stati sottoposti a trascrizione inversa. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 20 µl, composti da:

- 50 mM Tris-HCl (pH 8.3),
- 75 mM KCl,
- 3 mM MgCl₂,
- 5 mM DTT,
- 1 mM dNTPs,
- 2.5 mM random hexamer primers,
- 20 U RNase OUT,
- 100 U SuperScript III RT

(Tutti i reagenti sono stati acquistati dalla Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

I tubi di reazione sono stati incubati a 25 °C per 10 minuti, poi a 42 °C per 1 ora e infine a 95 °C per 5 minuti così da inattivare la reazione. Come controlli negativi sono stati analizzati anche due tubi: un tubo senza RNA; uno con RNA ma in assenza dell'enzima retrotrascrittasi. Allo scopo di quantificare il tasso di recupero dell'RNA, anche 5 pg di mRNA di luciferasi (non soggetti all'isolamento dell'RNA) sono stati sottoposti alla sintesi di cDNA.

3.2.8.2 *Real Time PCR*

I primers per tutti i geni studiati sono elencati nella Tabella 3.2. La quantificazione relativa dei trascritti è stata eseguita tramite Real Time PCR con lo strumento StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). La PCR è avvenuta in un volume di reazione di 15 µl contenenti 7.5 µl di 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200nM di ciascun primer e il cDNA equivalente a 5 ng di RNA.

Il protocollo di PCR consisteva in una fase di incubazione (95°C per 10 minuti), seguita da 40 cicli del programma di amplificazione (95 °C per 15 secondi, temperatura di appaiamento gene-specifica (Tabella 3.2) per 1 minuto e 72 °C per 30 secondi), un programma per la curva di melting (60 °C–95 °C, inizio dell'acquisizione della fluorescenza a 60 °C e raccolta delle misure ad intervalli di 10 secondi sino al raggiungimento della temperatura di 95 °C), infine

una tappa di raffreddamento a 4 °C. I dati di fluorescenza sono stati acquisiti durante le tappe di estensione a 72 °C. Per minimizzare le variazioni dovute alle manipolazioni, tutti i campioni da comparare sono stati inseriti nella medesima corsa di reazione usando una master mix di PCR contenente tutti i componenti di reazione eccetto il campione. La quantificazione relativa dell'espressione genica è stata eseguita con il metodo 2-ddCq (Livak and Schmittgen, 2001). L'analisi dell'espressione è stata condotta normalizzando ciascun gene target contro la media di 4 geni di riferimento interni (*succinate dehydrogenase complex subunit A [SDHA]*, *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta [YWHAZ]*, *ribosomal protein L9 [RPL9]*, and *actin B [ACTB]*). Prima della normalizzazione è stata verificata l'espressione stabile dei geni riferimento in tutti i gruppi in esame.

Tabella 3.2. Descrizione dei primers utilizzati negli esperimenti di Real Time PCR delle oWJC.

Gene	Gene-name	Accession number	Primers-sequence	Ta	Size (bps)
<i>ACTB</i>	Actin-B	NM_001009784	F: 5' TTCCTGGGTATGGATCCTG 3' R: 5' GGTGATCTCCTTCTGCATCC 3'	60° C	162
<i>RPL9</i>	Ribosomal protein L9	XM_004012837	F: 5' CAACTCCCGCCAGCAGAT 3' R: 5' CCGGGAATGGACAGTCACA 3'	56° C	127
<i>SDHA</i>	Succinate Dehydrogenase	XM_004017097	F: 5' CATCCACTACATGACGGAGCA 3' R: 5' ATCTTGCCATCTTCAGTTCTGCTA3'	60° C	125
<i>YWHAZ</i>	Tyrosine b monooxygenase	NM_001267887	F: 5' TGTAGGAGCCCGTAGGTCATCT 3' R: 5' TTCTCTCTGTATTCTCGAGCCATCT 3'	60° C	168
<i>OCT4/ POU5F1</i>	POU domain class 5, transcription factor 1	NM_174580	F: 5' GAGGAGTCCCAGGACATCAA 3' R: 5' CCGCAGCTTACACATGTTCT 3'	56° C	204
<i>NANOG</i>	Nanog homeobox	FJ970651	F: 5' GATCTGCTTATTCAGGACAG 3' R: 5' TGCATTTGCTGGAGACTGAG 3'	56°C	203
<i>SOX2</i>	SRY-box 2	NM_001318074	F: 5' ACCAGCTCGCAGACCTACAT 3' R: 5' CCCTGGAGTGGGAAGAAGAG 3'	60°C	159
<i>TERT</i>	telomerase reverse transcriptase	EU139125	F: 5' GGAGACCACGTTCCAGAAGA 3' R:5' GCCTGACCTCTGCTTCTGAC 3'	62°C	131
<i>LPL</i>	lipoprotein lipase	NM_001009394	F: 5' CTTCAACCACAGCAGCAAAA 3' R: 5' AAAGTTGGCCACATCCTGTC 3'	60°C	211
<i>PPARG</i>	peroxisome proliferator- activated receptor gamma	NM_001100921	F: 5' GCCCTGGCAAAGCATTGTA 3' R: 5' TGCTGTGCTCTTTCCCGTCA 3'	60°C	94
<i>OCN</i>	bone gamma- carboxyglutamate protein	DQ418490	F: 5' AGACACCATGAGAACCCCAT 3' R: 5' TTGAGCTCACACACCTCCCT 3'	60°C	234
<i>COL1A1</i>	collagen type I alpha 1 chain	XM_015098715	F: 5' CGGCTCTGCTCCTCTTAG 3' R: 5' TAAGTTCGTCGAGATCACG 3'	60°C	93
<i>NEFM</i>	neurofilament medium	FJ427307	F: 5' CCACGACCTTAGCAGCTACC 3' R: 5' CAGAGCCATCTTGACGTTGA 3'	60°C	124
<i>NEFL</i>	neurofilament light	XM_015093090	F: 5' CGCTATGCAGGACACAATCAAC 3' R: 5' GGGTCTCCTCACCTTCCAAGA 3'	60°C	160
<i>CD29</i>	integrin subunit beta 1	AF349461	F: 5' GTGCCCGAGCCTTCAATAAAG 3' R: 5' CCCGATTTTCAACCTTGGTAATG 3'	60°C	87
<i>CD34</i>	CD34 molecule	XM_015099394	F: 5' AATGGGACCACAGCAGTCAC 3' R: 5' CGCCTCTGAAGTCGTAAAGC 3'	60°C	94
<i>CD74</i>	CD74 molecule	XM_012178802	F: 5' tcatctccaacctgagcag 3' R: 5' caagacagaaaagcccgtgt 3'	62°C	102

3.2.9 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con il pacchetto software STATA 11.2/IC (StataCorp LP, USA). I dati di vitalità sono stati esaminati con il test del chi-quadro. I dati dei trascritti sono stati analizzati con il test non parametrici della somma dei ranghi di Wicoxon e il test dei ranghi di Kruskal-Wallis. Le differenze sono state considerate significative quando $p < 0.05$.

3.3 Esperimento 3 (seme)

3.3.1 Raccolta del seme

I campioni di seme sono stati raccolti da $n=3$ arieti di razza Sarda e riuniti insieme per essere analizzati come un unico campione. Gli esperimenti sono stati condotti esclusivamente con seme avente percentuali di motilità ≥ 85 %. La concentrazione e la motilità del seme fresco, dei campioni congelati e di quelli parzialmente liofilizzati sono state valutate utilizzando il sistema CASA (Ivos, Hamilton Thorne, Biosciences).

3.3.2 Preparazione del campione

Il campione di seme è stato diluito sino ad una concentrazione pari a 50 milioni di cellule/ml. Le diluizioni sono state effettuate impiegando due soluzioni alternative così composte:

- soluzione Lyo A: 0,2 M Tris, 20 % tuorlo d'uovo, 0,25 M trealosio e 0,4 M sorbitolo;
- soluzione Lyo B: 0,2 M Tris, 20 % tuorlo d'uovo, 0,16 M trealosio e 0,26 M sorbitolo.

3.3.3 Trattamento termico

I campioni diluiti Lyo A e Lyo B sono stati divisi in due aliquote ciascuno e portati alla temperatura di -10°C tramite congelamento o liofilizzazione parziale. I gruppi analizzati sono i seguenti:

- Lyo A congelato;
- Lyo A liofilizzato;
- Lyo B congelato;
- Lyo B liofilizzato.

Le metodiche impiegate per il trattamento termico sono brevemente descritte di seguito.

3.3.3.1 Congelamento

La procedura di congelamento è stata realizzata tramite un criomicroscopio equipaggiato con lo stage BCS196 (Linkam, UK).

I campioni Lyo A e Lyo B ($10\ \mu\text{l}$) sono stati depositi sopra un vetrino circolare preraffreddato a -10°C e mantenuti a tale temperatura per 10 minuti sulla piastra d'argento del criomicroscopio. Durante tale fase è stata monitorata la frazione non cristallizzata (U), così come descritto di seguito. Le analisi sono state ripetute in triplicato.

3.3.3.2 Liofilizzazione parziale (*Partial freeze-drying*)

La procedura di liofilizzazione è stata realizzata impiegando uno strumento di nuova realizzazione chiamato Darya (FertileSafe, Nes-Ziona, Israel), composto da un cilindro metallico, del volume di 1 L, da alloggiare nel collo di un bidone contenente azoto liquido. Il cilindro è diviso in due compartimenti (Figura.3.3): 1) un condensatore, immerso a livello dell'azoto liquido; 2) un compartimento di alloggiamento dei campioni, la cui temperatura è regolata da un impianto riscaldante. Il sistema è collegato ad una pompa a vuoto ed è in grado di generare una rapida riduzione della pressione sino a 10 mTorr.

Negli esperimenti, il valore di pressione è stato impostato a 80 mTorr e la temperatura è stata regolata a -10°C al fine di favorire un'ottimale velocità di sublimazione delle soluzioni.

La parziale liofilizzazione è stata realizzata caricando 10 µl di campione Lyo A o Lyo B sopra vetrini coprioggetto inseriti nell'apposito alloggiamento dello strumento.

I campioni sono stati scongelati posizionando i vetrini sopra una piastra riscaldata (38 °C) e reidratati con un volume di acqua demineralizzata pari ai µl originali di sospensione. La procedura è stata realizzata in triplicato.

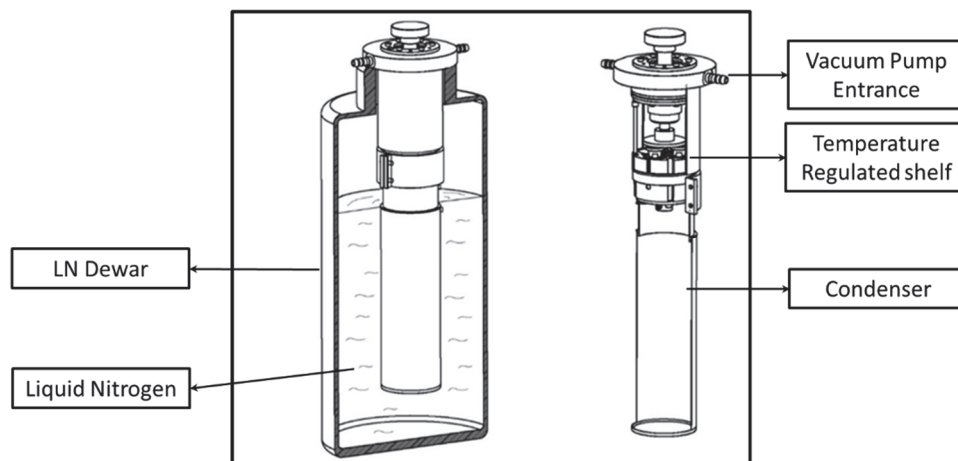


Figura 3.3: rappresentazione schematica del dispositivo di liofilizzazione Darya (FertileSafe, Nes-Ziona, Israel).

3.3.4 Analisi della cristallizzazione

3.3.4.1 Misurazioni al criomicroscopio: frazione non cristallizzata

Le analisi di criomicroscopia sono state realizzate con il criomicroscopio ottico equipaggiato con lo stage BCS196 (Linkam, UK). I campioni Lyo A e Lyo B, congelati o parzialmente liofilizzati, sono stati mantenuti per 10 minuti alla temperatura di -10 °C.

La formazione del ghiaccio e la quantità di frazione non cristallizzata (U) sono state monitorate e registrate tramite la CCD camera e lo strumento di acquisizione delle immagini del software Linksys32. L'ammontare della frazione non congelata è stato stimato dal rapporto tra la frazione non congelata e l'area totale esaminata, secondo la formula seguente: $\% U = (A_t - A_c) / A_t * 100$, dove A_t rappresenta l'area totale e A_c l'area cristallizzata.

3.3.4.2 *Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)*

Il microscopio ottico a scansione (SEM, Zeiss, Oberkochen, Germany) impiegato nelle analisi era provvisto di una camera a vuoto in grado di isolare il campione dall'ambiente esterno ed ostacolare fenomeni di condensazione. Nella camera di alloggiamento sono stati depositi 5 μ l del seme diluito nella soluzione Lyo B. Il campione è stato mantenuto alla temperatura di -10 °C per 20 minuti in condizioni di pressione atmosferica (760 mTorr) e in condizioni di vuoto (75 mTorr). La struttura dei cristalli di ghiaccio è stata osservata al variare delle condizioni di pressione e le immagini dei campioni sono state raccolte.

3.3.5 *Analisi statistica*

Il confronto tra i valori di motilità è stato condotto con il test t di Student. Le differenze con $p < 0,05$ sono state considerate statisticamente significative. I dati sono riportati come media \pm deviazione standard.

4 Risultati

4.1 Esperimento 1 (fibroblasti dermici)

4.1.1 Vitalità, immunocitochimica e curve di crescita

Il parametro della vitalità è stato valutato sulla base dello stato di integrità della membrana cellulare applicando il colorante Trypan blue. Il test è stato eseguito su:

- campioni freschi non crioconservati (controllo),
- campioni crioconservati con il criomicroscopio (CM) e con la criocamera (CC) nel momento immediatamente successivo allo scongelamento (T0);
- campioni crioconservati nella criocamera e ricoltivati dopo lo scongelamento per ulteriori 24 (T24) e 48 ore (T48).

Per ciascuna classe il saggio è stato eseguito in triplicato (n=3). La Tabella 4.1 riporta la percentuale media dei valori di vitalità e il relativo errore standard (ES).

Tabella 4.1. Valori percentuali di vitalità (media \pm ES) in fibroblasti dermici ovini sottoposti a crioconservazione e ricoltura post scongelamento. Lettere in apice differenti (a, b) indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra i gruppi.

<i>Campione</i>	<i>T0</i>	<i>T24</i>	<i>T48</i>
<i>Fresco</i>	98% \pm 0.5 ^a	-	-
<i>Crioconservato in CM</i>	62% \pm 2.1 ^b	-	-
<i>Crioconservato in CC</i>	69% \pm 2.3 ^b	88% \pm 2.2	97% \pm 0.5

La vitalità dei campioni T0 crioconservati nel CM e nella CC è risultata significativamente più bassa ($p < 0,05$) rispetto al valore ottenuto nel gruppo controllo non crioconservato (fresco). Al contrario, nessuna differenza significativa è stata evidenziata tra i due gruppi crioconservati ($p > 0,05$).

La colorazione immunoistochimica con il marker vimentina, componente dei filamenti intermedi dei fibroblasti, ha mostrato una distribuzione uniforme della proteina nelle cellule

in coltura, unitamente alla peculiare morfologia affusolata di questo tipo cellulare (Figura 4.1A).

Inoltre, la valutazione delle caratteristiche di crescita in vitro ha restituito tempi di duplicazione pari a 20-22 ore per il gruppo controllo non crioconservato e compresi tra le 22-24 ore per il gruppo crioconservato (Figura. 4.1 B).

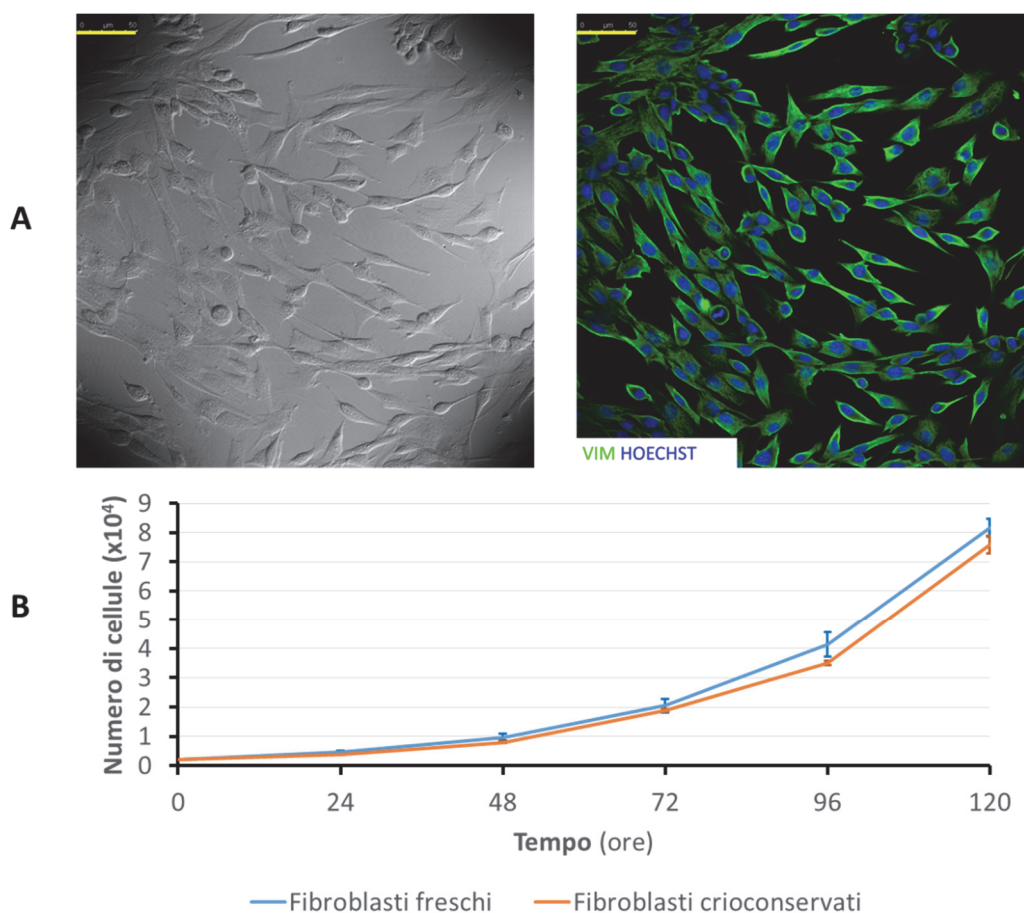


Figura 4.1. (A) Caratterizzazione dei fibroblasti dermici derivati da orecchio ovino. Le cellule hanno mostrato una morfologia allungata caratteristica del tipo cellulare. La positività della coltura alla colorazione delle strutture dei filamenti intermedi di vimentina (VIM) è stata indice di omogeneità della popolazione impiegata per l'allestimento degli esperimenti (Scala 50 μm). (B) Curva di crescita in vitro del campione cellulare. I tempi di duplicazione delle cellule fresche (20/22 ore, linea azzurra) e delle cellule crioconservate (22/24 ore, linea arancio) sono risultati in linea con i valori tipici della popolazione cellulare. I valori sono riportati come media \pm DS di tre replicati indipendenti.

4.1.2 Criomicroscopia e formazione del ghiaccio intracellulare

Durante l'esecuzione del profilo termico non è stato operato alcun controllo della temperatura di nucleazione del ghiaccio (T_n), determinando un verificarsi spontaneo della cristallizzazione. In assenza di un'induzione esterna, l'intervallo di T_n è risultato ampio e compreso tra $-16,6\text{ °C}$ e $-29,3\text{ °C}$. Nei 14 campioni esaminati, le temperature di formazione del ghiaccio extra e intracellulare (EIF, IIF) sono state annotate nell'arco dell'intero ciclo di congelamento-scongelo. Il darkening, o annerimento cellulare, è stato assunto come un'evidenza diretta della IIF e la temperatura di comparsa di questa manifestazione è stata annotata per ciascuna cellula. Per ogni campione analizzato, almeno una cellula ha manifestato IIF nel momento in cui era toccata dall'onda di propagazione dell'EIF. Per questa ragione, la temperatura di EIF ha coinciso con la temperatura di IIF della prima cellula annerita. Il 45% delle cellule ha manifestato IIF in un ristretto intervallo di temperature compreso tra -20 °C e -23 °C (Figura 4.2).

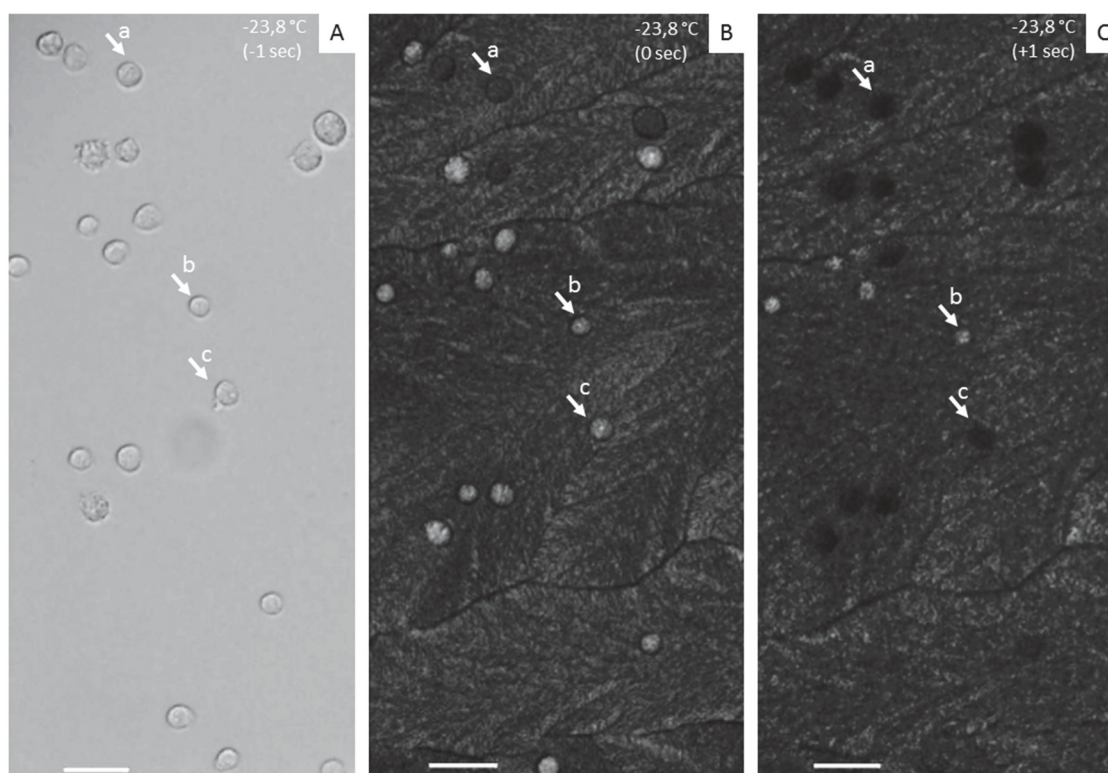


Figura 4.2. Immagini di criomicroscopia acquisite durante la fase di raffreddamento. Panoramica dei fibroblasti alla temperatura di $-23,8\text{ °C}$ nel momento della formazione del ghiaccio extra (EIF) e intracellulare (IIF). I tre fotogrammi sono stati registrati ad intervalli di 1 secondo. (A) Cellule prima della formazione spontanea del ghiaccio (-1 sec). (B) Cellule nel ghiaccio extracellulare appena formato (0 sec). (C) Cellule dopo la formazione del ghiaccio nel mezzo esterno (+1 sec). (B, C) Le immagini mostrano cellule con ghiaccio intracellulare evidente (annerite) comparso durante (freccia a) o dopo (freccia c) la fase di formazione del ghiaccio extracellulare. In alcune cellule l'IIF è risultata assente nell'intero arco del profilo termico (freccia b). Scala $40\text{ }\mu\text{m}$.

Il numero di cellule che hanno esibito darkening e il valore di temperatura corrispondente sono stati elaborati per ottenere il grafico in Figura 4.3 che rappresenta la probabilità di formazione del ghiaccio intracellulare (PIIF) dei fibroblasti crioconservati con il 10 % di DMSO alla velocità di raffreddamento di 5 °C/min. Delle 195 cellule esaminate, il 21 % non ha manifestato segni evidenti di IIF durante l'arco dell'intero protocollo di crioconservazione. Le misurazioni effettuate ante-EIF (+15 °C/-20 °C) non hanno evidenziato alcuna variazione dei volumi cellulari.

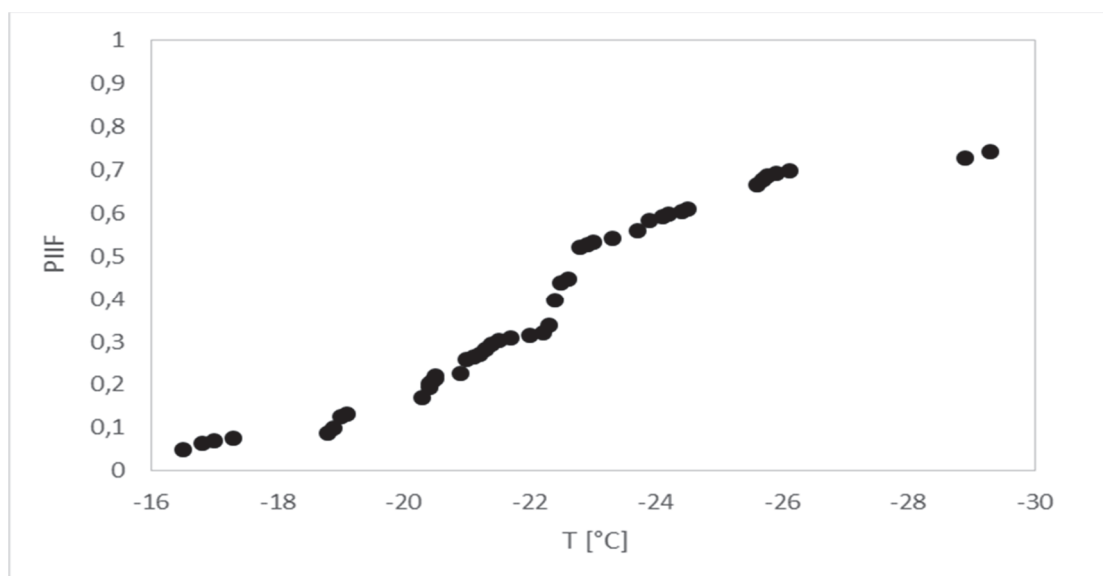


Figura 4.3. Il grafico mostra la probabilità di formazione del ghiaccio intracellulare (PIIF) in funzione della temperatura. I dati sono stati ottenuti dall'analisi dei filmati registrati con la CCD camera (1 fps) durante l'esecuzione degli esperimenti al criomicroscopio. L'asse Y mostra la frazione cumulativa delle cellule che hanno sperimentato l'IIF e che sono state individuate per la presenza del *darkening* (annerimento). Il campione di fibroblasti ovini è stato crioconservato alla velocità di 5°C/min fino a -120°C, per raggiungere la temperatura finale di -196°C alla velocità di 150°C/min.

4.1.3 Espressione genica

La quantificazione relativa dei trascritti è descritta nella Figura 4.4. Le cellule crioconservate hanno mostrato una maggiore espressione dei trascritti BCL2, OCT4 e GAPDH alle 24 ore successive allo scongelamento rispetto ai relativi controlli ($p < 0,01$). Inoltre, nelle cellule crioconservate è stata osservata una sovraregolazione di HSP90b e SOD1 a tutti i tempi esaminati. Al contrario, durante l'intero lasso di tempo esaminato, non sono state osservate differenze nella quantità dei trascritti BAX, CIRBP e KIF11 tra il campione di controllo e quelli crioconservati.

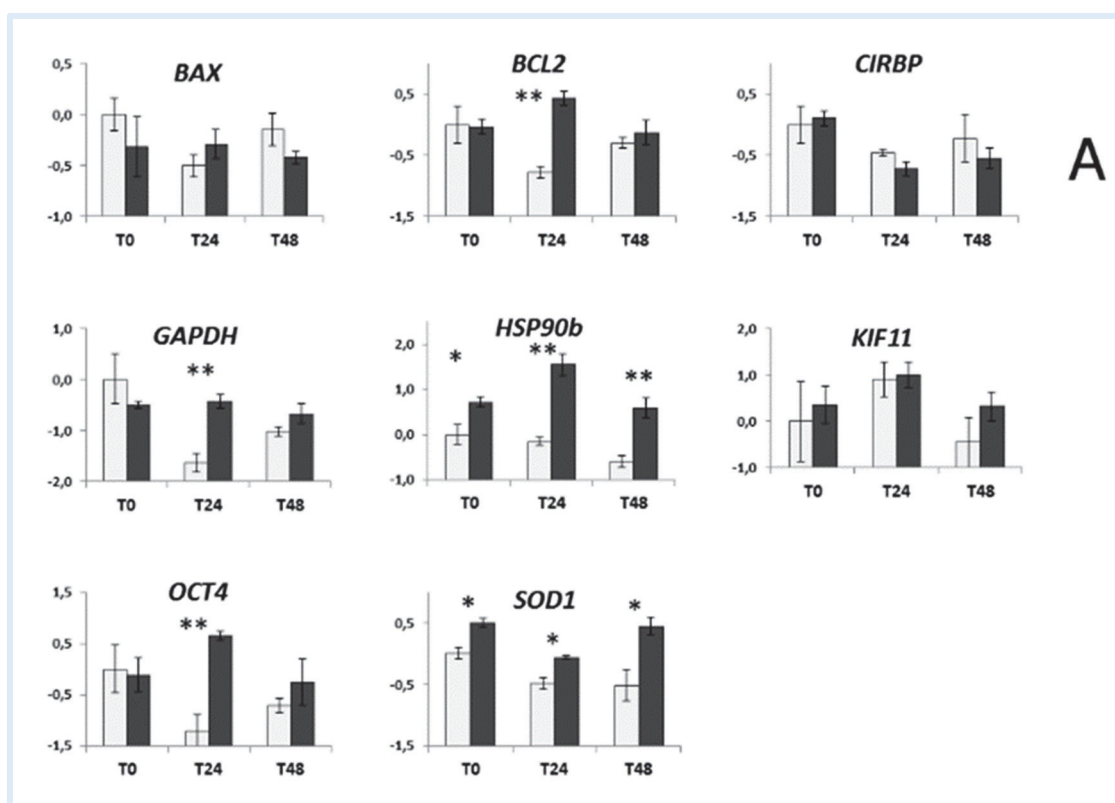
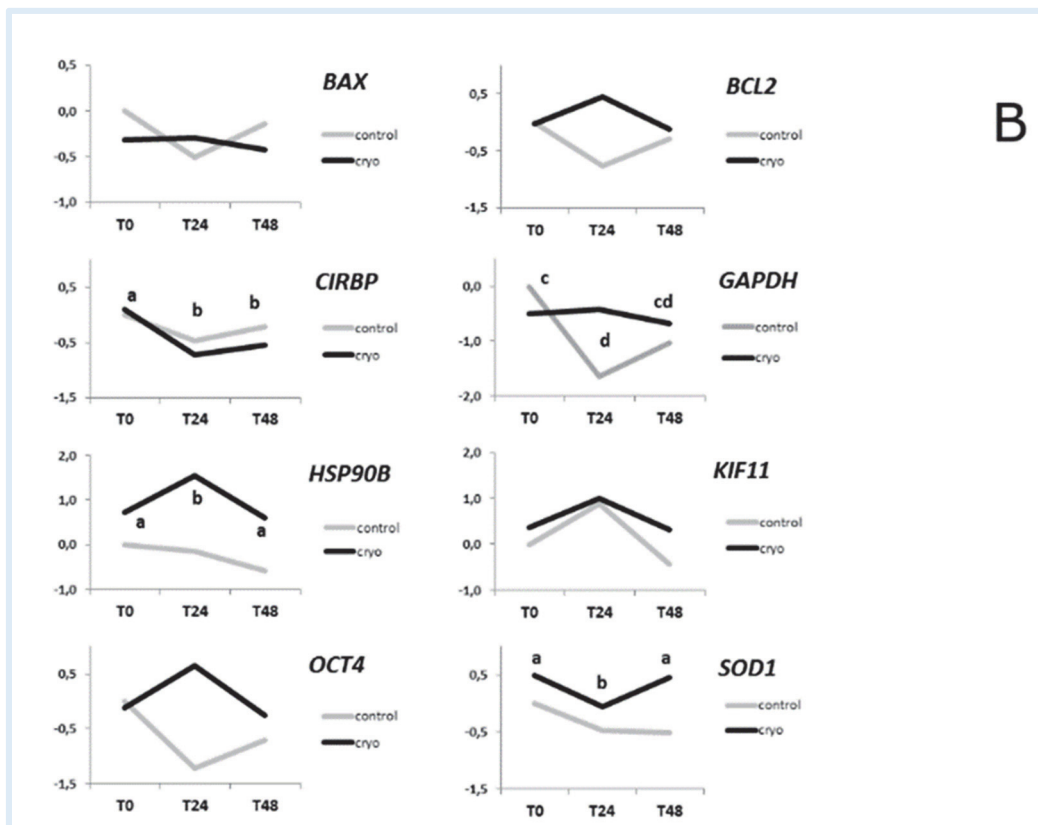


Figura 4.4. Espressione relativa dei geni *BAX*, *BCL2*, *CIRBP*, *GAPDH*, *HSP90b*, *KIF11*, *OCT4* e *SOD1* nei fibroblasti crioconservati e coltivati *in vitro* per diversi tempi (T0 = analizzati immediatamente dopo lo scongelamento; T24 = coltivati *in vitro* per 24 ore dopo lo scongelamento; T48 = coltivati *in vitro* per 48 ore dopo lo scongelamento) e nei relativi controlli non sottoposti a crioconservazione. Per ciascun gruppo sperimentale, i valori di abbondanza relativa sono espressi come ΔCq e mostrano il valore medio \pm l'errore standard (ES) di tre replicati. (A) Espressione relativa nei fibroblasti crioconservati e controllo per ciascun tempo. Barre vuote = controlli; Barre nere = fibroblasti crioconservati. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Pannello (B) pagina seguente.



Continuo Figura 4.4. (B) Andamento dell'espressione genica durante l'intervallo di 48 ore post scongelamento della coltura *in vitro*. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative nell'espressione tra i diversi tempi dello stesso trattamento (a e b nei fibroblasti crioconservati; c e d nei campioni controllo).

4.2 Esperimento 2 (cellule della gelatina di Wharton)

4.2.1 Vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata stimata tramite due test di integrità di membrana: la colorazione di Trypan blue (TB) visibile in campo luminoso e la colorazione con Hoechst/Ioduro di propidio (HP) visibile in fluorescenza.

I saggi sono stati eseguiti nelle seguenti classi:

- campioni freschi non crioconservati (CTR1);
- campioni equilibrati nelle Slow solutions (CTR2);
- campioni equilibrati nelle Fast solutions (CTR3);
- campioni post scongelamento (T0_C) e post ricoltura di 48 ore (T48_C) crioconservati con il protocollo classico;
- campioni post scongelamento (T0_L) e post ricoltura di 48 ore (T48_L) crioconservati con il protocollo lento;
- campioni post scongelamento (T0_R) e post ricoltura di 48 ore (T48_R) crioconservati con il protocollo rapido.

I risultati di ciascuna classe sono stati ottenuti dall'analisi di due replicati biologici (n=2).

I dati sono stati analizzati eseguendo tre tipologie di comparazione:

- a) confronti intra-classe intra-protocollo inter-coloranti, tesi a saggiare per ciascuna classe, entro il medesimo protocollo, l'equiparabilità dei risultati forniti dalle due colorazioni;
- b) confronti inter-classi intra-colorante e intra-protocollo, tesi a saggiare l'equiparabilità dei dati di vitalità ottenuti entro ciascun protocollo tra le classi temporali esaminate;
- c) confronti intra-classe intra-colorante inter-protocolli, tesi a saggiare l'equiparabilità dei dati ottenuti nei tre protocolli di crioconservazione.

I risultati del confronto inter-coloranti (confronto *a*) sono mostrati in Figura 4.5. Dalle analisi è emerso che i dati ottenuti impiegando i due metodi di valutazione dell'integrità di membrana (TB e HP) hanno fornito dei risultati comparabili a livello di ciascuna classe, ad eccezione dei dati ottenuti nelle classi T0_C (TB 78,15 % vs HP 69,12 %) e T0_R (TB 17,72 % vs HP 9,19 %) per le quali le due colorazioni hanno restituito dei dati statisticamente differenti ($p < 0,05$).

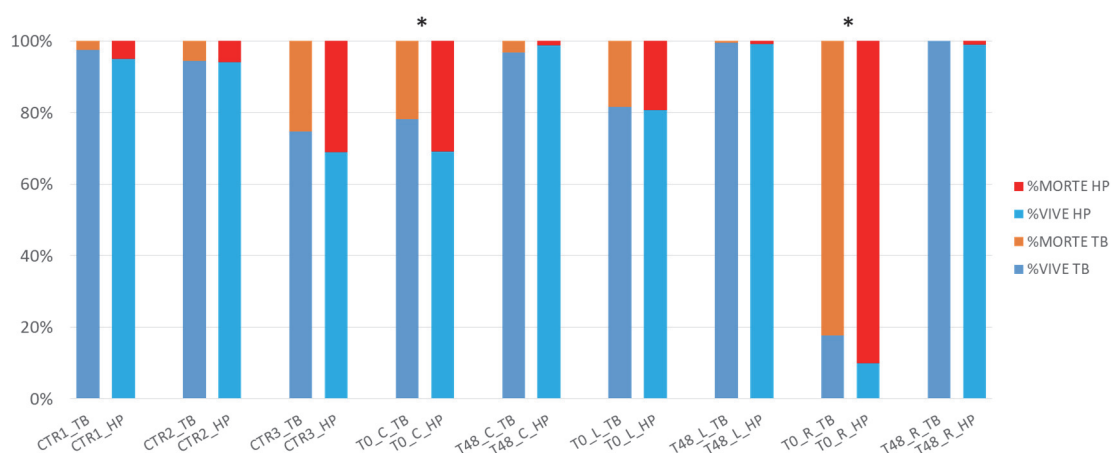


Figura 4.5. Confronto inter-coloranti dei risultati di vitalità cellulare. Il grafico mostra, per ciascuna classe, le percentuali di vitalità cellulare ottenute con la colorazione di Trypan blue (TB) e con la colorazione in fluorescenza Hoechst/Ioduro di propidio (HP). Le differenze tra risultati ottenuti con le due colorazioni a livello di ciascuna classe sono indicate da un asterisco ($*p < 0,05$).

La Figura 4.6 mostra l'analisi dei dati dei confronti intra-protocollo (confronto *b*). Per ciascuno dei tre protocolli esaminati, i valori di vitalità hanno subito un decremento nel passaggio dal campione fresco (CTR1) alle soluzioni di equilibratura (CTR2 o CTR3). Tale decremento non risulta statisticamente significativo per i protocolli classico e lento controllato (CTR1 vs CTR2), mentre appare significativo ($p < 0,05$) per quanto concerne il protocollo rapido (CTR1 vs CTR3,). Un ulteriore decremento della vitalità è stato osservato nella classe T0. In ognuno dei tre protocolli, la riduzione al T0 post scongelamento è risultata significativa quando comparata con i rispettivi gruppi controllo ($p < 0,05$). Tali confronti hanno trovato riscontro nei risultati ottenuti con entrambe le colorazioni (Figure 4.6 A e 4.6 B).

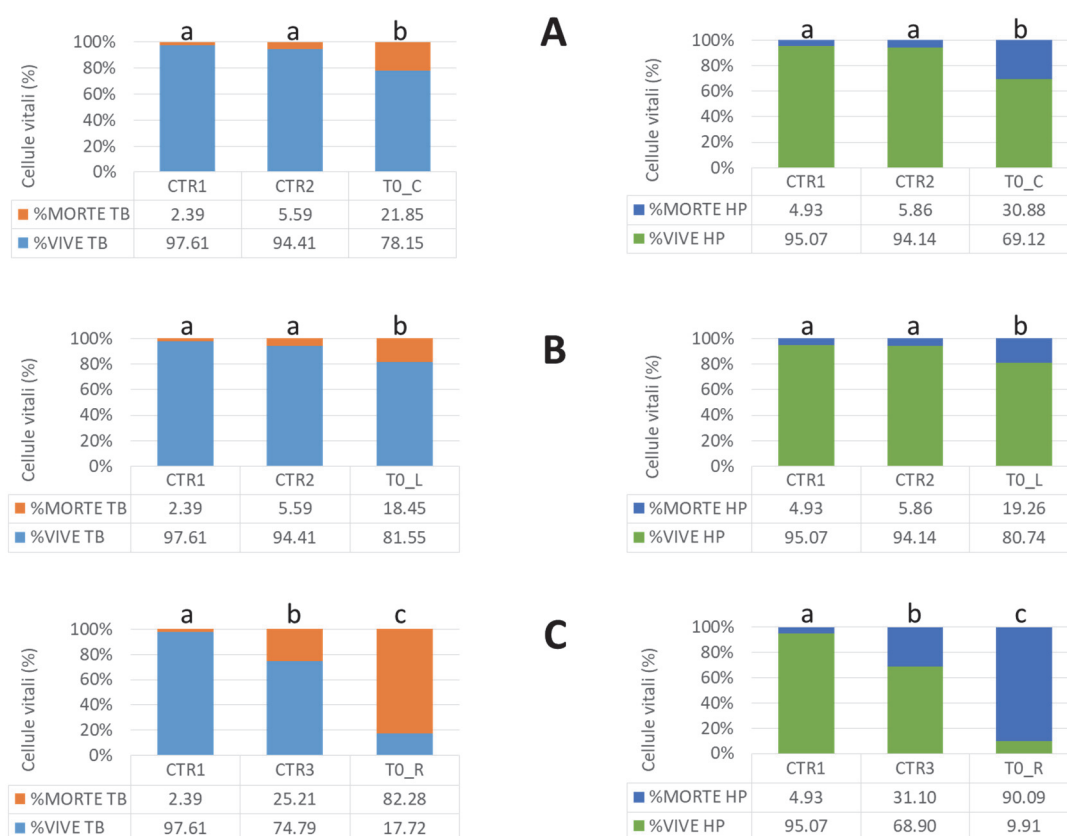


Figura 4.6. Confronto intra-protocollo dei risultati di vitalità cellulare. I grafici sulla sinistra mostrano le percentuali di vitalità cellulare ottenute con la colorazione di Trypan blue (TB), quelli sulla destra i dati ottenuti con la colorazione in fluorescenza Hoechst/Ioduro di propidio (HP). (A) Protocollo classico; (B) Protocollo lento-controllato; (C) Protocollo rapido. Per ciascun protocollo, lettere diverse indicano differenze significative tra le classi ($p < 0,05$).

Infine, i risultati della comparazione intra-classe, realizzata confrontando i risultati ottenuti nei tre diversi protocolli per la stessa classe (confronto *c*), sono mostrati in Figura 4.7. Il confronto tra i due campioni controllo protocollo-specifici (CTR2 vs CTR3) ha mostrato una

differenza significativa nel numero di cellule vitali conteggiate al termine delle fasi di equilibratura ($p < 0,05$, Figura 4.7 A).

Inoltre, la vitalità della classe TO_R è risultata differire in maniera significativa dalle classi TO_C e TO_L ($p < 0,05$). La colorazione HP ha evidenziato una significativa differenza anche tra le classi TO_C e TO_L ($p < 0,05$), ma il dato non ha trovato riscontro nei risultati rilevati con il TB (Figura 4.7 B).

Per quanto concerne le classi T48, i dati della vitalità ottenuti nelle cellule crioconservate e ricoltivate per 48 ore non hanno mostrato differenze significative tra i tre protocolli. I risultati riportati devono essere intesi in proporzione al numero di cellule vitali presenti nella fase precedente la ricoltura. Le percentuali ottenute per le classi T48 sono le seguenti: 96,60 % (T48_C_TB), 98,76 % (T48_C_HP), 99,58 % (T48_L_TB), 99,09 % (T48_L_HP), 100 % (T48_R_TB), 98,90 % (T48_R_HP).

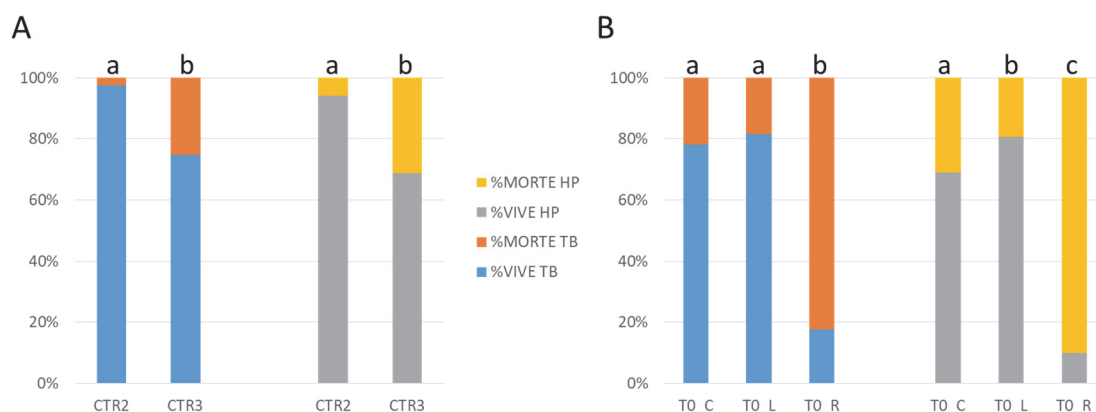


Figura 4.7. Confronto intra-classe dei risultati di vitalità cellulare. I grafici mostrano le percentuali di vitalità cellulare ottenute con la colorazione di Trypan blue (TB) a con la colorazione in fluorescenza Hoechst/Ioduro di propidio (HP). (A) Confronto tra i due campioni controllo protocollo-specifici; (B) Confronto tra i campioni delle classi TO. Per ciascuna raggruppamento di classi, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra le classi ($p < 0,05$).

Il complesso delle analisi dei dati effettuate sui risultati della vitalità cellulare sono schematizzati nella Figura 4.8.

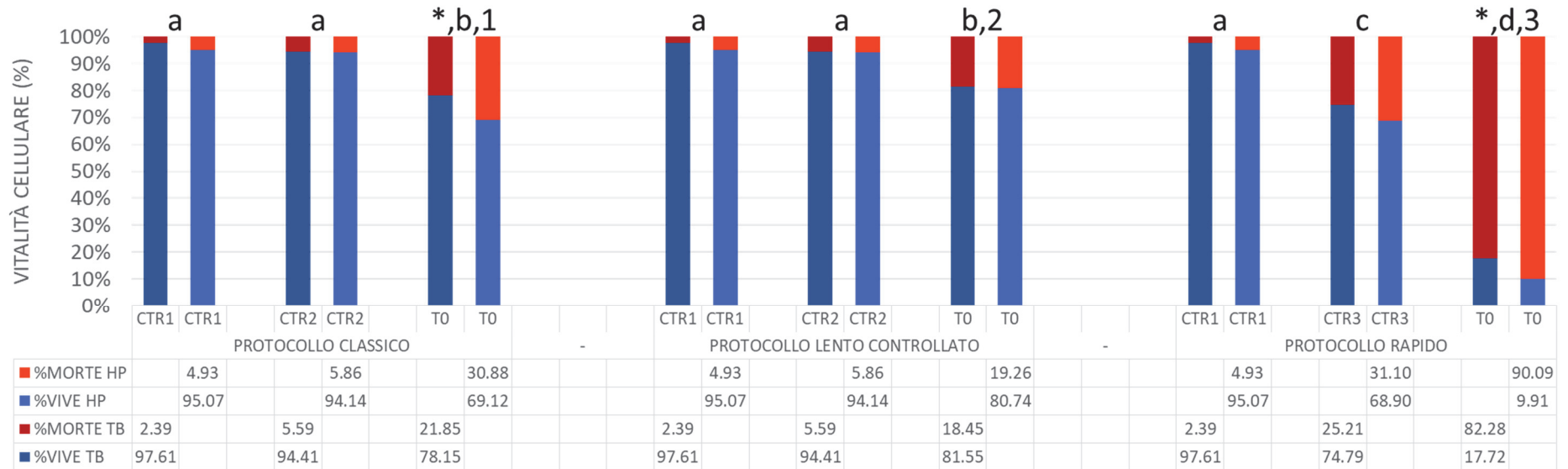


Figura 4.8. Risultati di vitalità nelle diverse classi analizzate. I risultati dei confronti multipli sono indicati come descritto di seguito:

- le differenze del confronto inter-colorante (confronto a) sono indicate con *;
- le differenze dei confronti inter-classe (confronto b) e inter-protocolli (confronto c) sono indicati con lettere minuscole, dove lettere diverse indicano differenze statisticamente significative;
- le differenze del confronto inter-protocolli (confronto c) riscontrate solo dalla colorazione con Hoechst/Ioduro di propidio (HP) sono indicate con numeri.

Sono state considerate significative le differenze con $p < 0,05$.

4.2.2 Proliferazione cellulare

Le cellule della gelatina di Wharton prelevata da tessuto cordonale ovino (oWJC) sono state testate con saggi di proliferazione cellulare sino al decimo passaggio in coltura.

La valutazione della capacità di formare colonie (CFU) è stata effettuata a P1 nelle cellule fresche. In media le oWJC sono state in grado di costituire 1 CFU ogni $164,66 \pm 27,29$ cellule. Il maggior numero di colonie è stato riscontrato alla densità di semina intermedie cioè 250 e 500 cellule/cm² (Tabella 4.2).

Tabella 4.2. Valutazione della capacità di formare colonie nelle oWJC.

Densità di cellule/cm ²	Numero totale cellule	CFU	1 CFU ogni
100	950	5.3 ± 9.64	178.12
250	2375	39 ± 32.11	60.89
500	4750	71 ± 24.28	66.90
1000	9500	74 ± 2.44	128.37

I risultati ottenuti nelle curve di crescita a P1, P5 e P10 sono mostrati nella Figura 4.9. La fase di latenza iniziale (fase lag) si è protratta per i primi 4 giorni in tutti i passaggi osservati. Una fase di crescita logaritmica meno pronunciata ma più duratura è stata evidenziata nel P1 fino al 12° giorno. Al contrario, rispetto al P1 sia le cellule P5 sia quelle P10 hanno esibito una proliferazione più marcata a seguito del giorno 4. Tuttavia, in queste cellule la fase di latenza è apparsa precocemente al 10° giorno (Figura 4.9).

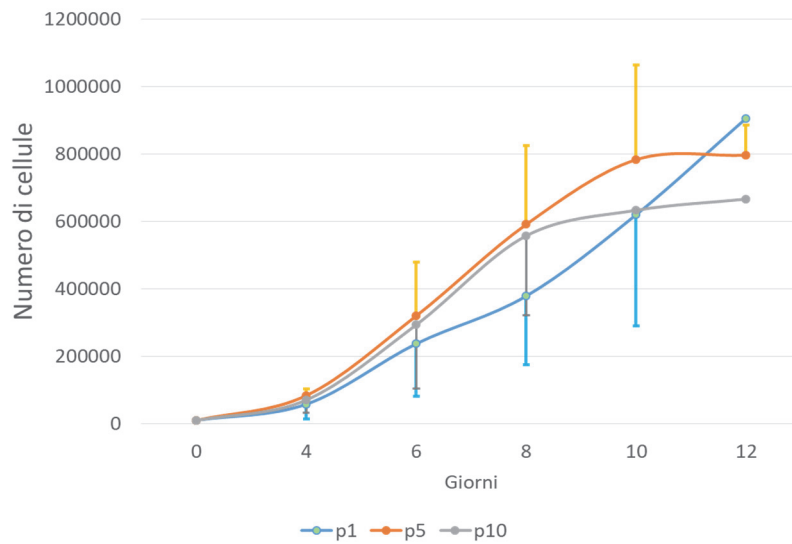


Figura 4.9. Curva di crescita delle oWJC a P1, P5 e P10. Media \pm DS (n=4).

Il tempo medio di duplicazione della popolazione cellulare (PDT) è stato di $1.45 \pm 0,13$ giorni pari a $34,78 \pm 3,36$ ore. L'andamento dei tempi di duplicazione da P1 a P10 è illustrato nella Figura 4.10.

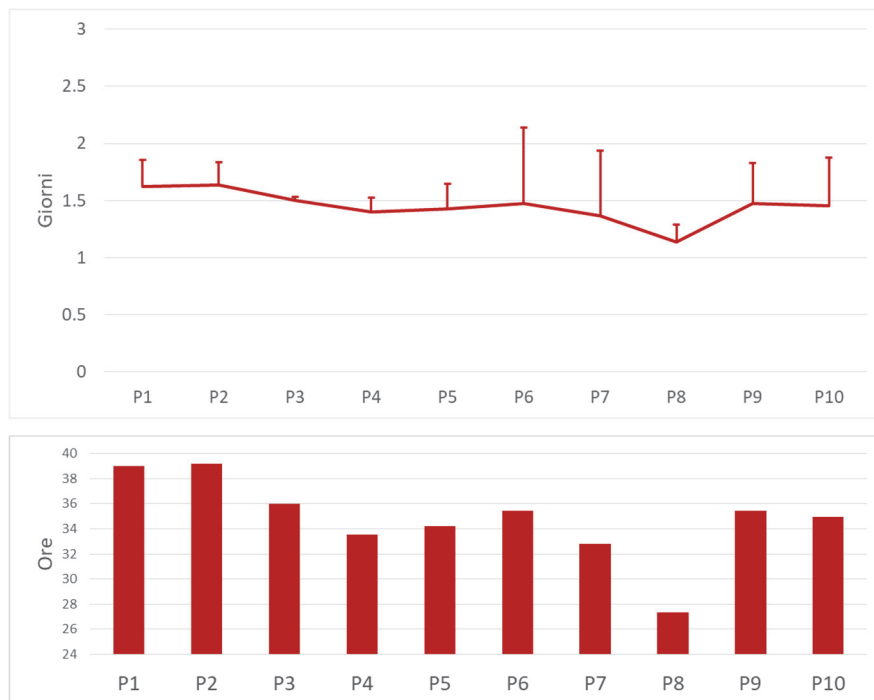


Figura 4.10. Tempi di duplicazione della popolazione (PDT) delle oWJC in coltura. Media \pm DS (n=4).

4.2.3 Capacità differenziativa: colorazione istochimica

I risultati delle colorazioni istochimiche eseguite in seguito all'induzione al differenziamento verso le linee adipogenica, osteogenica e neurogenica sono presentati nella Figura 4.11.

Le oWJC al passaggio 1 sono state in grado di differenziare verso la linea adipogenica, come visibile dall'estesa colorazione delle gocce di lipidi neutri evidenziata con il saggio Oil Red O dopo 21 giorni di induzione. Nei campioni crioconservati, il raggiungimento di uno stadio di confluenza e il conseguente verificarsi di fenomeni di distacco dello strato cellulare dopo 15 giorni dall'induzione hanno reso necessario anticipare la verifica dell'avvenuto differenziamento tramite colorazione istochimica. Nelle cellule crioconservate con il protocollo classico (C) non è stata riscontrata la presenza delle caratteristiche gocce lipidiche, mentre le cellule crioconservate con il protocollo lento (L) hanno mostrato una debole presenza dell'attesa colorazione rossa. Le cellule di controllo, mantenute in coltura con il terreno base, non hanno mostrato depositi lipidici.

La differenziazione in senso osteogenico e la presenza dei caratteristici depositi di calcio, visibili a seguito della colorazione di Von Kossa, è stata riscontrata sia nelle cellule fresche a P1 che in entrambi i campioni di cellule crioconservate (P6). Tuttavia, l'estesa proliferazione e precoci fenomeni di distacco dello strato cellulare, hanno permesso di protrarre l'induzione dei campioni crioconservati per soli 15 giorni contro i 21 delle cellule non crioconservate. I campioni controllo non hanno mostrato alcuna presenza di aggregati di calcio.

A seguito dell'induzione in senso neurogenico, le cellule fresche P1 hanno esibito una morfologia tipicamente neuronale evidenziata dalla colorazione di Nissl. Il campione delle cellule crioconservate con il protocollo classico (C) ha mostrato alcune cellule con una morfologia triangolare e conica simil-neuronale, mentre nel campione delle cellule crioconservate con il protocollo lento (L) sono state ritrovate alcune cellule con morfologia bipolare simil-neuronale. Le cellule di controllo non hanno mostrato alcun segno di differenziamento.

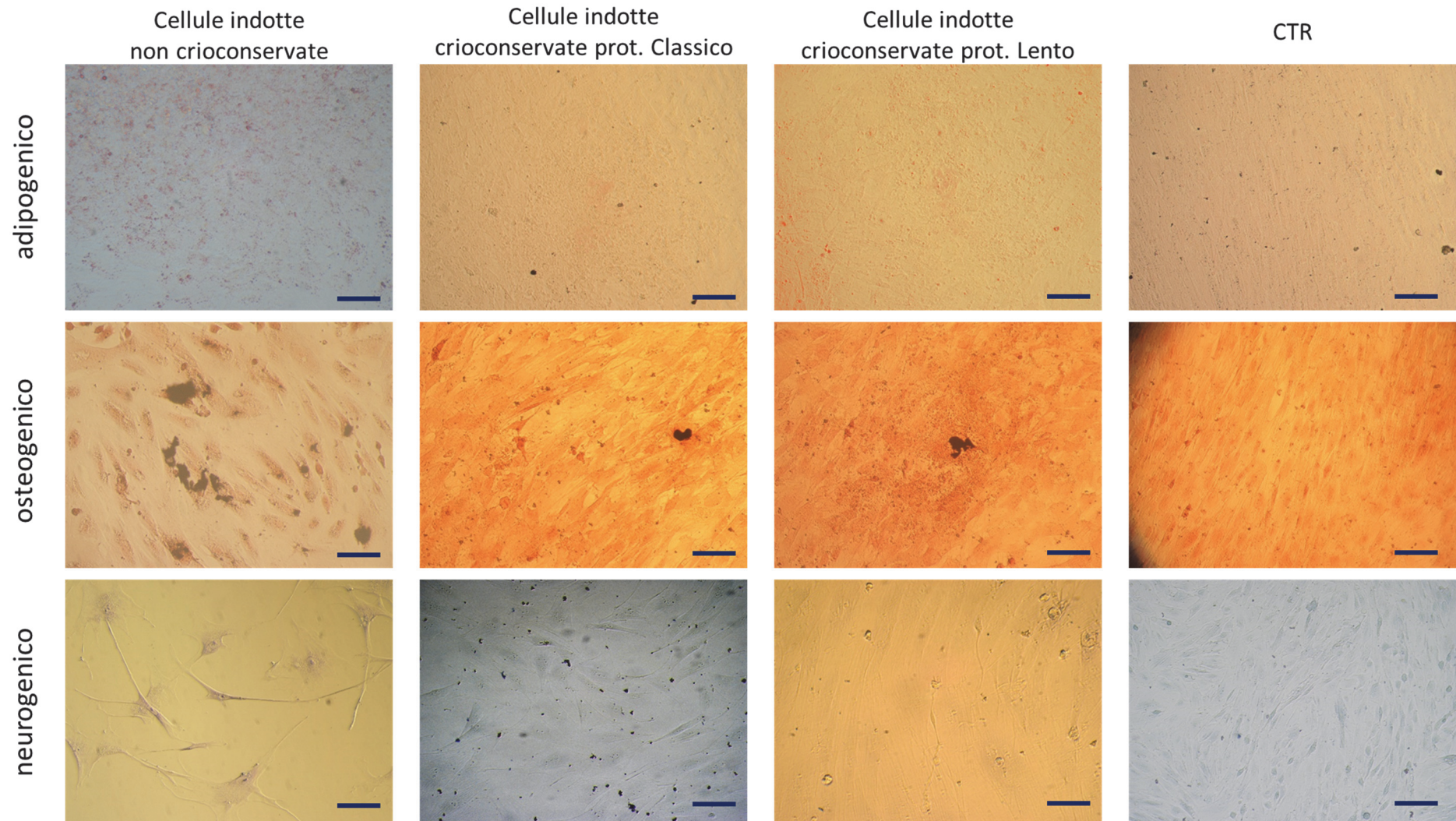


Figura 4.11. Colorazione istochimica delle oWJC indotte ai differenziamenti prima e dopo crioconservazione e dei controlli non indotti (CTR). Il differenziamento adipogenico è stato valutato con la colorazione Oil red O; il differenziamento osteogenico è stato valutato con la colorazione di von Kossa; il differenziamento neurogenico è stato valutato con la colorazione di Nissl. Scala 20 μ m.

4.2.4 Espressione genica

4.2.4.1 Staminalità, origine mesenchimale e immunogenicità

La quantificazione dei trascritti dei marcatori di pluripotenza *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* e *TERT* è avvenuta tramite la metodica della Real Time PCR.

I campioni esaminati erano costituiti da cellule fresche (campioni controllo) o crioconservate secondo i tre diversi protocolli (C, L, R) e non sottoposte ad alcuna procedura di differenziamento. L'analisi dei dati ha inteso valutare l'effetto del tempo (T0; T48) e del protocollo utilizzato (classico; lento-controllato; rapido) relativamente ai livelli di espressione esibiti nei campioni controllo.

I risultati riguardanti il marcatore *OCT4* sono rappresentati nella Figura 4.12. Il trascritto appare espresso sia nel campione controllo sia nei campioni crioconservati. Una leggera riduzione nei livelli del trascritto è stata evidenziata nella classe T48 dei tre protocolli. L'analisi dei dati non ha rilevato alcuna differenza significativa tra i gruppi.

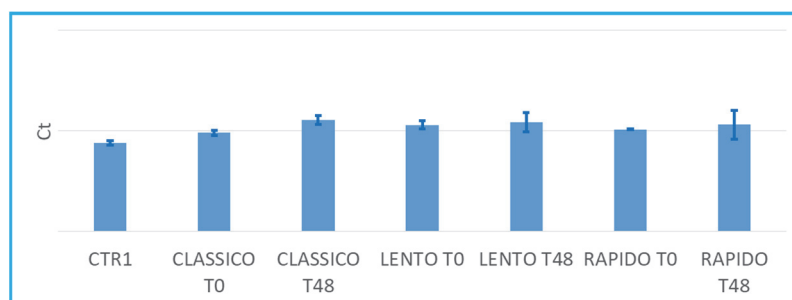


Figura 4.12. Risultato dei livelli di espressione genica del marcatore *OCT4* nelle diverse classi di campioni di oWJC crioconservate secondo i tre protocolli (classico, lento-controllato e rapido) e coltivate in vitro per diversi tempi (T0 = analizzate immediatamente dopo lo scongelamento; T48 = coltivate in vitro per 48 ore dopo lo scongelamento). Il controllo è rappresentato dalle cellule non sottoposte a crioconservazione (CTR1). I dati sono rappresentati come media \pm DS dei valori di ciclo soglia (Ct = threshold cycle).

I trascritti *SOX2* e *TERT* sono risultati assenti sia nei campioni controllo che nei campioni crioconservati.

Problemi di natura tecnica hanno impedito la quantificazione del trascritto *NANOG* nei campioni controllo, impedendo il confronto con i livelli di espressione rinvenuti nei campioni crioconservati.

In tutti i campioni è stata confermata la presenza del marcatore mesenchimale *CD29*, mentre il marcatore emopoietico *CD34* è risultato assente. Anche l'espressione del marcatore immunologico *MHC II (CD74)* è risultata assente sia nei campioni pre che post crioconservazione.

4.2.4.2 Differenziamento in senso mesodermico ed ectodermico

A seguito delle procedure di differenziamento delle cellule P1 fresche e P6 crioconservate, la capacità differenziativa delle oWJC è stata ulteriormente indagata tramite la valutazione qualitativa dell'espressione di marcatori linea-specifici. Come controllo negativo è stato impiegato l'RNA estratto da cellule non differenziate e non crioconservate. Una sintesi dei risultati ottenuti è presentata nella Tabella 4.3.

Tabella 4.3. Sintesi de risultati di espressione genica dei marcatori linea specifici. I simboli “+” e “/” indicano rispettivamente presenza e assenza del marcatore. La notazione “1/2” indica la presenza del marcatore in un solo replicato biologico.

Campione	Adipogenica		Osteogenico		Neurogenica	
	LPL	PPARG	COLA1	OCN	NEFM	NELF
Fresco (P1)	+	+	+	½	/	/
Crio (P6)	+	+	+	½	/	/

La presenza dei marcatori *LPL* e *PPARG* ha confermato la differenziazione in senso adipogenico nelle cellule P1 non crioconservate. L'espressione dei marcatori è stata confermata anche nelle cellule crioconservate.

La differenziazione osteogenica è stata confermata dalla presenza del marcatore *COLA1* sia nelle cellule fresche P1 sia nelle cellule crioconservate P6. Solo un replicato biologico ha mostrato la presenza del marcatore *OCN*, sia nelle cellule fresche sia in quelle crioconservate.

Non è stato possibile riscontrare la presenza dei marcatori neurogenici *NEFM* e *NELF* nei campioni esaminati.

Le analisi in Real Time PCR dei controlli positivi (tessuti adiposo, osseo e cerebrale di ovino) hanno mostrato l'espressione dei marcatori delle tre linee.

4.3 Esperimento 3 (seme)

4.3.1 Motilità cellulare

La motilità del seme misurata nel gruppo di controllo al momento del prelievo era pari al $86 \pm 2\%$. I valori di motilità dei campioni diluiti nelle soluzioni Lyo A e Lyo B a seguito del congelamento e della procedura di liofilizzazione parziale a -10°C sono risultati come segue: $3 \pm 1,4\%$ (Lyo A congelato), $3 \pm 2\%$ (Lyo B congelato), $6,5 \pm 2\%$ (Lyo A liofilizzato), $8 \pm 1,2\%$ (Lyo B liofilizzato). Non sono presenti differenze significative tra i gruppi trattati.

4.3.2 Frazione non cristallizzata in criomicroscopia

L'ammontare della frazione non cristallizzata (U) è stato stimato nei campioni Lyo A e Lyo B a seguito delle procedure di congelamento e di liofilizzazione parziale.

Le immagini riportate in Figura 4.13 mostrano la morfologia dei cristalli di ghiaccio e della frazione non congelata nelle quattro classi di campioni esaminati.

Nei campioni Lyo A congelati la percentuale di U era pari al 19% (Figura 4.13 A), mentre nello stesso campione sottoposto a liofilizzazione la percentuale registrata è risultata pari al 28% (Figura 4.13 C).

I campioni congelati a -10°C per 10 minuti della soluzione Lyo B hanno mostrato una percentuale di frazione non congelata pari al 13% (Figura 4.13 B), mentre i campioni corrispondenti liofilizzati hanno mostrato una percentuale più che doppia pari al 30% (Figura 4.13 D).

Nel complesso, la dimensione dei cristalli di ghiaccio delle soluzioni parzialmente liofilizzate è risultata inferiore (Figura 4.13 C, D) rispetto a quella delle soluzioni congelate (Figura 4.13 A, B).

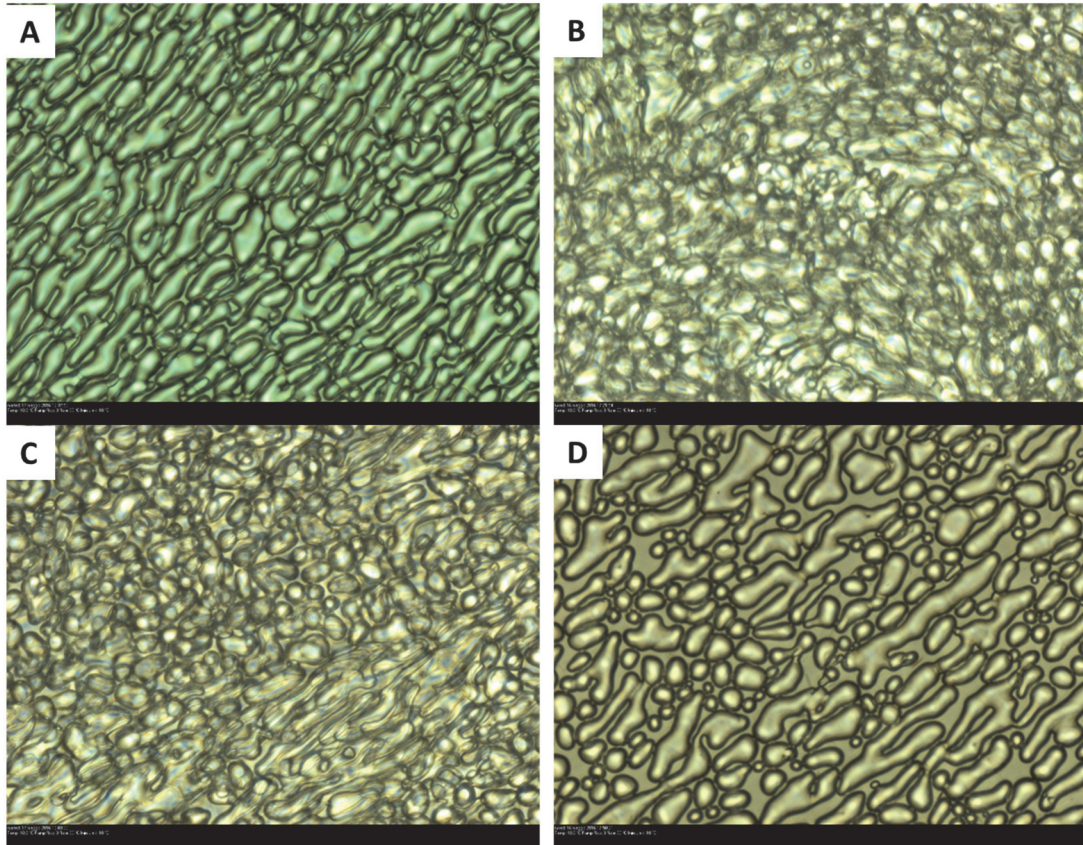


Figura 4.13. Frazione non cristallizzata nei campioni Lyo A (A,C) e Lyo b (B,D) sottoposti a congelamento (A, B) o a parziale liofilizzazione (C, D). I campioni sono stati raffreddati sino a -10°C e mantenuti a tale temperatura per 10 minuti. Ingrandimento 10 X.

4.3.3 Struttura dei cristalli di ghiaccio al SEM

Le immagini in microscopia elettronica a scansione della soluzione Lyo B sono mostrate nella Figura 4.14.

I campioni parzialmente liofilizzati attraverso un processo di sublimazione a -10°C in condizioni di vuoto pari a 75 mTorr hanno mostrato una struttura dei cristalli di ghiaccio poco densa e ricca di cavità (Figura 4.14 B). Per contro, i campioni di soluzione Lyo B congelata in condizioni di pressione atmosferica e non liofilizzata hanno mostrato una struttura compatta e piena (Figura 4.14 A).

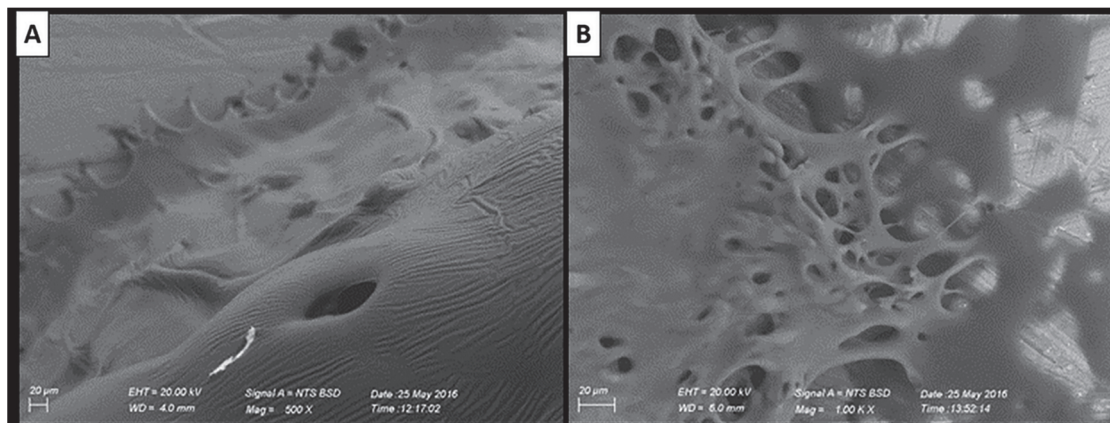


Figura 4.14. (A) Struttura della frazione cristallizzata nella soluzione Lyo B congelata e mantenuta alla temperatura di -10°C in condizioni di pressione atmosferica. (B) Struttura della frazione cristallizzata nella soluzione Lyo B parzialmente liofilizzata (75 mTorr).

5 DISCUSSIONE

“Le implicazioni e le applicazioni delle cellule ibernatae derivano principalmente dal fatto che la conservazione a temperature inferiori a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ interrompe in maniera efficace il tempo biologico” (Mazur, 1984). Questa considerazione, espressa da Peter Mazur nel 1984, riassume il rilevante ruolo scientifico rivestito dalla crioconservazione, il cui fondamento risiede nella possibilità di superare la barriera del tempo per conservare inalterate le proprietà biologiche del materiale di partenza. Attualmente essa rappresenta la metodica più diffusa finalizzata alla preservazione a lungo termine delle risorse biologiche e costituisce una tappa propedeutica alla realizzazione di un’ampia gamma di applicazioni successive.

Tuttavia, l’esposizione a temperature criogeniche rappresenta un notevole elemento di stress in grado di alterare le caratteristiche morfo-funzionali delle cellule a seguito dell’insorgenza di varie tipologie di danno. In relazione al ruolo biologico svolto nell’organismo, ogni tipo cellulare è dotato di proprietà strutturali e biochimiche peculiari che determinano un diverso grado di suscettibilità/resistenza alle metodiche di crioconservazione. Per questa ragione, materiali biologici dotati di una maggiore complessità strutturale ed eterogeneità cellulare, come i tessuti e gli organi, presentano maggiori ostacoli alla realizzazione di una crioconservazione adeguata. Nonostante nella pratica routinaria siano spesso impiegate metodiche di crioconservazione convenzionali, basate sul discese termiche incontrollate (Naaldijk et al., 2013), in vista del miglioramento dell’efficienza del processo di conservazione, dell’impatto che questo esercita sulle successive applicazioni e di esigenze di preservazione dipendenti dalla natura del campione, risulta indispensabile perfezionare le tecniche esistenti e approntare soluzioni progettate su misura. Questi miglioramenti possono trarre giovamento dalla comprensione dei meccanismi di base che intervengono sul piano fisico-chimico e biologico-molecolare nei sistemi di crioconservazione (cellule e ambiente circostante).

Il lavoro sviluppato nella presente tesi ha inteso analizzare gli eventi fisici e biologici connessi con il processo di crioconservazione. Tre casi di studio, distinti per tipologia cellulare e condizioni sperimentali impiegate, sono stati esaminati al fine di ottenere una panoramica dei meccanismi e delle specifiche risposte cellulari generate dall’esposizione a temperature criogeniche. A questo scopo sono state predisposte varie tipologie di analisi tese ad esaminare le risposte biologiche (sopravvivenza, motilità, espressione di marcatori apoptotici, metabolici, legati allo stress termico, alla multipotenza, alla capacità differenziativa) e i fenomeni fisici (formazione del

ghiaccio intra ed extracellulare, variazioni volumetriche, frazione di soluzione non congelata) generati dallo specifico trattamento termico. Fibroblasti, cellule staminali della gelatina di Wharton e spermatozoi di origine ovina sono stati selezionati in quanto appartenenti a distinte tipologie cellulari, quali rispettivamente cellule somatiche, staminali e germinali.

5.1 FIBROBLASTI DERMICI

Il primo gruppo di esperimenti è stato rivolto allo studio degli eventi fisici legati alla crioconservazione e all'analisi delle risposte biologiche suscitate dallo specifico trattamento termico in un campione di fibroblasti dermici ovini neo isolati. La realizzazione dell'esperimento di crioconservazione ha richiesto l'impiego di due strumentazioni complementari, criomicroscopio (CM) e criocamera (CC). Con il primo è stato possibile osservare l'evento di congelamento "dall'interno" impiegando un piccolo volume di campione, mentre con il secondo strumento è stato possibile operare la crioconservazione su un volume di sospensione cellulare maggiore tale da permettere la realizzazione delle successive analisi molecolari.

I risultati riportati forniscono importanti informazioni in merito alla dinamica di formazione del ghiaccio intracellulare e allo stato di espressione di un pannello di geni durante un periodo di 48 ore successivo allo scongelamento.

5.1.1 Isolamento e caratterizzazione dei fibroblasti

Nel nostro esperimento l'isolamento è stato operato con la metodica dell'espianto che ha permesso di osservare l'inizio della migrazione cellulare intorno al quinto giorno di coltura. Le cellule sono state caratterizzate tramite analisi immunocitochimica mostrando una distribuzione uniforme della marcatura con vimentina, che ha confermato l'omogeneità del nostro campione e la sua natura mesenchimale. I fibroblasti hanno esibito la tipica morfologia allungata e l'analisi delle curve di crescita ha mostrato tempi di duplicazione di 20-22 ore. I dati colturali riportati sono in linea con quanto riportato in letteratura per questo tipo cellulare (Brevini et al., 2016).

5.1.2 Vitalità post crioconservazione

A seguito della crioconservazione la percentuale di sopravvivenza esibita dalle cellule controllo (98 %) ha subito un decremento di circa il 30 % ($p < 0,05$). Infatti, la valutazione della vitalità cellulare osservata immediatamente dopo lo scongelamento (T0) nei campioni crioconservati con il CM e con la CC ha mostrato percentuali di vitalità rispettivamente del 62 % e 69 %, tra le quali non è stata rinvenuta alcuna differenza significativa ($p > 0,05$). L'accordo tra i valori di vitalità ottenuti nel CM e nella CC evidenzia che, in presenza di una comune velocità di raffreddamento ($5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$), le differenze presenti nel volume di campione ($5\text{ }\mu\text{l}$ vs $210\text{ }\mu\text{l}$) e nella modalità di scongelamento (controllata nel CM e non controllata nella CC) non hanno influito in maniera significativa sulla condizione vitale del campione. Questo dato avvalorava l'assunto alla base del presente lavoro che ha considerato quanto rinvenuto a livello molecolare nei campioni recuperati dalla CC e quanto osservato nei campioni congelati con il CM come rappresentativo della stessa condizione termica sperimentata dalle cellule. Il numero di cellule vitali al T0 è in accordo con i valori presenti in letteratura a seguito della crioconservazione di fibroblasti tramite simili profili termici (Kearney, 1991), (Naaldijk et al., 2013).

Alcuni autori sono concordi nell'affermare che l'analisi dell'efficacia di una procedura di crioconservazione non possa limitarsi nel considerare esclusivamente la condizione cellulare presente nel momento immediatamente successivo allo scongelamento ma debba essere prolungata nel corso del periodo successivo (Naaldijk et al., 2013), (Baust et al., 2009).

Le analisi della vitalità a seguito di un periodo di 24 e 48 di coltura in vitro post scongelamento hanno mostrato un numero crescente di cellule vitali (88 % in T24, 97 % in T48) suggerendo che le cellule hanno beneficiato di un periodo di coltura in vitro per riprendere la normale crescita cellulare.

5.1.3 Gli eventi fisici della crioconservazione

Il criomicroscopio permette di osservare gli eventi che si verificano all'interno delle cellule durante le fasi di raffreddamento e riscaldamento di una procedura di crioconservazione. In particolare, è possibile individuare il tempo e la temperatura alla quale appare la formazione del ghiaccio intracellulare (IIF) per ciascuna cellula presente nel campione. La manifestazione visibile che comunemente è associata alla IIF è rappresentata dall'annerimento del corpo cellulare (darkening). Tuttavia, Stott e Karlsson (2009) hanno osservato che non esiste una stretta connessione tra l'annerimento cellulare e l'evento primario di IIF, e che il cosiddetto darkening rappresenta una

manifestazione secondaria che interviene quando il fronte di IIF ha già attraversato il corpo cellulare. Essi affermano che interpretare il darkening come la manifestazione di un'improvvisa nucleazione di un gran numero di cristalli di ghiaccio non è corretto in quanto esiste un intervallo di tempo tra l'IIF e l'annerimento cellulare che non risulta apprezzabile con gli strumenti di ripresa convenzionali (Stott and Karlsson, 2009). Nonostante questo, la maggior parte dei ricercatori rileva il darkening come strettamente connesso con la IIF (Spindler et al., 2012), (Toner et al., 1993), (Yi et al., 2014) e impiega questo evento nell'analisi della probabilità di formazione del ghiaccio intracellulare (Choi and Bischof, 2011), (Xu et al., 2014). In accordo con questa convenzione, i risultati degli esperimenti condotti con il CM, e riportati nella Figura 4.3, indicano che solo il 20 % delle cellule non ha manifestato IIF. Tale valore appare notevolmente inferiore rispetto alla percentuale di cellule con membrana integra rilevata al T0 (60 %-70 %), suggerendo che lo stato vitale post-scongelo è stato mantenuto anche nelle cellule che hanno sperimentato l'IIF. Questo dato sembrerebbe in disaccordo con uno dei principi cardine della criobiologia che individua nell'IIF uno dei principali eventi letali della crioconservazione. Tuttavia, un crescente numero di studi ha dimostrato che l'IIF non costituisce un evento necessariamente letale (Freimark et al., 2011), (Yu et al., 2017). La causa del danno non risiederebbe nella mera presenza dei cristalli intracellulari ma piuttosto nella loro quantità e dimensione (Acker, 2015). Sebbene le osservazioni effettuate al CM durante la crioconservazione dei fibroblasti non consentono di speculare sulla qualità dell'IIF, quanto osservato appare in accordo con gli studi a favore dell'esistenza di un IIF innocua o addirittura protettiva (Acker and McGann, 2002), (Acker and McGann, 2003).

La temperatura di nucleazione (T_n) è strettamente connessa con la IIF e il controllo attivo dell'induzione del primo nucleo di ghiaccio può migliorare la resa di cellule vitali (Morris and Acton, 2013). Sebbene il seeding del ghiaccio (nucleazione indotta) sia una pratica raccomandata, diversi autori evitano il seeding anche nella realizzazione dei profili di crioconservazione con velocità controllata (Naaldijk et al., 2013), (Liu et al., 2000), (Tathagata and V., 2010), (Ji et al., 2004), (Watt et al., 2007), (Rodrigues et al., 2008), (Naaldijk et al., 2012). Nel nostro esperimento, la nucleazione è stata fatta avvenire spontaneamente per rispecchiare al meglio le condizioni dei protocolli applicati durante la conservazione routinaria di campioni cellulari (in vials o paillettes). Inoltre, effettuare la nucleazione del ghiaccio tramite il punto di induzione predisposto nel CM avrebbe richiesto lo spostamento del campione dal piano di ripresa della telecamera, impedendo di monitorare in maniera corretta il comportamento cellulare delle stesse cellule prima e dopo il seeding. Nel presente esperimento, in assenza di induzione esterna, l'intervallo di temperature alle

quali è avvenuta la nucleazione era compreso tra $-16,6^{\circ}\text{C}$ e $-29,3^{\circ}\text{C}$. Questi dati sono in accordo con le variazioni della Tn che sono state riportate durante la crioconservazione di MSC umane senza induzione del seeding (Freimark et al., 2011).

5.1.4 Espressione genica post crioconservazione

Come è noto, la crioconservazione innesca l'espressione di una serie di geni coinvolti nel recupero del danno cellulare, nell'apoptosi e nella risposta allo stress termico (Davies et al., 2014), (Fong et al., 2015), (Karimi-Busheri et al., 2013), (Monzo et al., 2012), (Sonna et al., 2002). Uno studio teso ad analizzare l'espressione genica di fibroblasti crioconservati ha rilevato che dopo 48 ore dallo scongelamento le cellule presentavano una sovraregolazione nei livelli di trascritti appartenenti a fattori di crescita quali il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) e il fattore di crescita dei cheratinociti (KGF), insieme ad una riduzione dei trascritti codificanti per proteine della matrice, suggerendo che, a seguito dello stress indotto dal trattamento termico, fosse presente una sorta di classifica nella quale le molecole deputate alla proliferazione cellulare avevano la priorità (Liu et al., 2000). Come è noto, la crioconservazione altera l'espressione di alcuni geni e i loro livelli di espressione possono aumentare o diminuire a seconda della via metabolica nella quale sono coinvolti (Yang et al., 2016). Baust et al. (2009) hanno riportato che a seguito del congelamento la realizzazione completa di una risposta apoptotica si manifesta con un picco tra le 12-36 ore dallo scongelamento, provocando una significativa morte cellulare nei campioni osservati dopo 24 e 48 ore (Baust et al., 2009). Per una valutazione affidabile e coerente degli effetti biologici esercitati della crioconservazione è auspicabile che si effettui un monitoraggio delle cellule nel periodo post scongelamento di almeno 24 ore (Naaldijk et al., 2013), (Borderie et al., 1998), (Saraste and Pulkki, 2000).

In accordo con quanto riportato, i risultati ottenuti nel nostro esperimento hanno mostrato che la crioconservazione ha indotto un significativo aumento nei livelli di espressione di cinque degli otto geni analizzati (Figura 4.4). Nello specifico, i campioni crioconservati hanno mostrato un aumento nel livello di espressione dei geni *HSP90b* e *SOD1* durante l'intero arco della coltura post scongelamento (0-48 ore). La sovraregolazione di questi due geni è correlata con la risposta cellulare allo stress e suggerisce un tentativo cellulare di riparazione del potenziale danno generato dalla crioconservazione. Infatti, il prodotto di *HSP90b* è coinvolto nel ripiegamento strutturale delle macromolecole, nella regolazione dello stato di ossido-riduzione e nel ricambio proteico (Sonna et

al., 2002), mentre gli elevati livelli di *SOD1* sono indice della presenza di stress ossidativo determinato dall'aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Turathum et al., 2010).

I geni *BCL2*, *GAPDH* e *OCT4* hanno mostrato una sovraregolazione transiente alle 24 ore post scongelamento, non più presente alle 48 ore, suggerendo che la crioconservazione ha determinato un'alterazione che le cellule sono state in grado di controllare nell'arco delle 48 ore. Il gene *BCL2* è coinvolto nella risposta anti-apoptotica e la sua attivazione transiente suggerisce l'attivazione di una risposta cellulare contro meccanismi di morte programmata indotti dallo shock termico. Una simile sovraregolazione di *BCL2* è stata riportata dopo 3 ore dallo scongelamento in colture cellulari di MSC (Ock and Rho, 2011), negli oociti di cane vitrificati e scongelati (Turathum et al., 2010) e in embrioni di topo crioconservati (Dhali et al., 2009). All'opposto, nelle colture post scongelamento di fibroblasti non abbiamo rilevato alcuna alterazione nell'espressione del gene pro-apoptotico *BAX*. Alle 24 ore post scongelamento, anche il trascritto di *GAPDH* ha mostrato un aumento di espressione. Questo gene codifica per un enzima glicolitico ed è spesso impiegato come gene housekeeping nelle analisi molecolari, tuttavia, la sua espressione è in realtà strettamente regolata e l'enzima codificato è coinvolto in numerose funzioni cellulari (Colell et al., 2009). Molti dei ruoli svolti da *GAPDH* dipendono dalla sua abilità nel legare altre molecole cellulari. Risultano particolarmente interessanti alcuni lavori che descrivono *GAPDH* come un regolatore della morte cellulare (Ishitani and Chuang, 1996), (Ishitani et al., 1996). L'esatto meccanismo attraverso il quale *GAPDH* svolge questo ruolo non-glicolitico rimane in gran parte ignoto, tuttavia, la variazione dei suoi livelli di mRNA e di proteina è stata osservata in risposta a diversi stimoli (Graven et al., 1999), (Alexander-Bridges et al., 1992). Infatti, il gene e la proteina *GAPDH* subiscono una regolazione attiva anche durante la proliferazione cellulare (Meyer-Siegler et al., 1992), (Mansur et al., 1993). Questo lavoro include la crioconservazione nell'insieme di stimoli che alterano l'espressione dell'enzima.

È interessante notare che abbiamo osservato bassi livelli del mRNA di *OCT4* nei fibroblasti coltivati *in vitro* e un inatteso aumento della sua espressione alle 24 ore post scongelamento. Il fattore Oct4 è un componente chiave della rete regolatoria della pluripotenza (Wu and Scholer, 2014). Il suo gene è espresso in maniera specifica nella massa interna dell'embrione ed è coinvolto nel mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali (Takahashi et al., 2007). Tuttavia, livelli basali del trascritto di *OCT4* sono stati riportati anche in linee di cellule somatiche non crioconservate, tra le quali anche fibroblasti (Wang et al., 2009). In particolare, la sua risposta è stata riportata in risposta a differenti tipi di stress cellulari come lo shock termico (Byun et al., 2013) e la

crioconservazione (Miki et al., 2016). Inoltre, fibroblasti umani coltivati in un ambiente con bassa concentrazione di ossigeno hanno mostrato un incremento transiente del gene embrionale *OCT4* (Page et al., 2009), (Jez et al., 2014). Nel nostro esperimento, la sovraregolazione di *OCT4* osservata alle 24 ore successive allo scongelamento potrebbe rappresentare una reazione rapida e transiente al cambiamento delle condizioni omeostatiche determinato dalla crioconservazione.

5.1.5 Conclusioni sui fibroblasti dermici

La variazione dinamica dell'espressione dei geni coinvolti nella risposta allo stress, nelle funzioni metaboliche e nella vitalità cellulare suggerisce che i fibroblasti dermici necessitano di un periodo di almeno 24-48 ore in condizioni colturali ottimali per attivare specifiche reti molecolari al fine di ristabilire le loro funzioni fisiologiche originali. La coltura di fibroblasti dermici ovini ha subito importanti cambiamenti morfologici e biochimici in conseguenza della procedura di crioconservazione. I dati riportati appaiono rilevanti al fine di migliorare le applicazioni dei fibroblasti nei vari settori biotecnologici (v. SCNT, iPSC) nei quali la crioconservazione rappresenta una tappa fondamentale per una corretta conservazione di scorte prontamente disponibili.

5.2 CELLULE MESENCHIMALI STROMALI DELLA GELATINA DI WHARTON

La seconda serie di esperimenti ha permesso l'isolamento, la caratterizzazione e la differenziazione delle cellule ovine della gelatina di Wharton (oWJC). Inoltre, il presente studio ha inteso valutare il mantenimento delle caratteristiche di multipotenza e della capacità differenziativa delle oWJC a seguito della crioconservazione. Per la prima volta, i risultati ottenuti offrono un approfondimento sul comportamento cellulare in conseguenza della realizzazione di tre protocolli termici volti alla preservazione delle cellule cordonali ovine.

5.2.1 Isolamento e proliferazione delle oWJC

Le oWJC sono state raccolte con successo a seguito dell'isolamento con la metodica della digestione enzimatica, che si è dimostrata una tecnica rapida, pratica ed efficace per l'ottenimento delle cellule presenti nella matrice cordonale ovina. La stessa metodica ha dimostrato di garantire un rapido allestimento di colture di WJC umane (Da-Croce et al., 2013), mentre nel bovino l'efficienza di isolamento da matrice cordonale è stata riportata a seguito di tempi di incubazione enzimatica di 8 ore (Lange-Consiglio et al., 2017). Tuttavia, altri autori riportano successi di isolamento di WJC umane (Fong et al., 2010) e ovine (Eswari et al., 2016) tramite migrazione cellulare da frammenti tissutali parzialmente digeriti, sebbene tale metodica richieda tempi maggiori (circa 7 giorni) per apprezzare la crescita della coltura e possa favorire la selezione di tipi cellulari co-residenti.

I quattro cordoni utilizzati (circa 10 cm) hanno permesso di ottenere un rendimento medio di $1,3 \times 10^6$ cellule vitali/grammo di gelatina di pura. Un'efficienza maggiore (3×10^6 cellule/grammo di gelatina pura) è stata riscontrata nell'isolamento da cordone bovino (Lange-Consiglio et al., 2017). Invece, risulta ardua la comparazione dei dati disponibili in letteratura nella specie ovina, in quanto l'unico lavoro sulle oWJC che riporta la resa di isolamento indica un numero pari a $10\text{-}15 \times 10^4$ cellule per sezioni di cordone di 2-4 cm, senza fornire alcuna informazione sul quantitativo di gelatina pura impiegata né sulle caratteristiche della coltura (Eswari et al., 2016). Per le stesse ragioni appare complicato effettuare un confronto anche con quanto riportato per le hWJC (Fong et al., 2010), dove la resa di $4,7 \times 10^6$ cellule/cm di cordone non tiene in considerazione la massa del frammento al netto dei vasi e dell'epitelio circostante.

Nel presente lavoro, la quasi totalità delle oWJC neo isolate è risultata vitale (98 %), mostrando una pronta capacità adesiva alle superfici plastiche delle fiasche di coltura, così come indicato nei criteri

di riconoscimento delle MSC (Dominici et al., 2006). La morfologia cellulare inizialmente fibroblastoide è stata mantenuta sino a P10. Nella coltura *in vitro* le oWJC hanno, inoltre, esibito una grande propensione all'espansione *ex vivo*, con un tempo di duplicazione medio di 34,78 ore monitorato dalle curve di crescita prodotte a differenti passaggi colturali. L'esame della capacità di formare colonie ha mostrato che le oWJC hanno costituito colonie partendo da differenti densità di semina ma hanno esibito una maggiore propensione nella costruzione di CFU alle densità intermedie pari a 250/500 cellule/cm². Nel complesso, il gran numero di WJC ottenute da cordone ovino e l'elevata prolificità dimostrata dalle oWJC per diversi passaggi di coltura *in vitro* risulta in accordo con quanto riportato in letteratura a proposito della maggiore efficienza delle cellule staminali mesenchimali umane (hMSC) estratte dagli annessi fetali rispetto alle cellule ottenute da altre sorgenti di staminali mesenchimali (Bongso and Fong, 2013). Tale efficienza è confermata anche nel bovino (Lange-Consiglio et al., 2017) e nelle cellule MSC estratte dal fluido amniotico, dal sangue e dalla matrice cordonale nell'equino (Iacono et al., 2012). Nell'ovino, le oWJC si sono dimostrate molto più proliferative rispetto alle MSC estratte dal sangue periferico (PB-MSC) e dal midollo osseo (BM-MSC) nelle quali i tempi di duplicazione cellulare (CD) riportati erano compresi tra 2,14 e 3,06 (Mediano et al., 2015), mentre le nostre analisi sulle oWJC hanno verificato tempi decisamente inferiori con un CD di 1,45.

Quanto riportato mostra che la gelatina di Wharton ovina può costituire una valida sorgente di MSC per le applicazioni terapeutiche rigenerative che necessitano di un numero consistente di cellule attivamente replicanti.

5.2.2 Caratterizzazione delle oWJC

Le analisi a sostegno della natura mesenchimale e staminale delle cellule cordonali ovine sono state condotte tramite la valutazione dell'espressione genica. Le oWJC mostrato di soddisfare i criteri minimi richiesti per la caratterizzazione delle MSC (Dominici et al., 2006). Per ragioni di praticità e data la scarsità di marcatori di superficie validati nel modello ovino (Lyahyai et al., 2012), le analisi molecolari sono state rivolte alla ricerca di pochi ma indispensabili marcatori di espressione del fenotipo antigenico. Le analisi dei trascritti hanno confermato la presenza del marcatore mesenchimale CD29 e l'assenza del marcatore CD34 della linea emopoietica in accordo con quanto osservato nelle WJC umane (Fong et al., 2010) e nelle cellule mesenchimali ovine del sangue periferico (Lyahyai et al., 2012), del midollo osseo (Mediano et al., 2015) e dell'epitelio amniotico (Barboni et al., 2014). Inoltre, nelle oWJC è risultata assente anche l'espressione del marcatore

CD74, così come precedentemente riportato nelle WJC bovine (Lange-Consiglio et al., 2017). L'antigene CD74 è una porzione polipeptidica invariante coinvolta nella funzionalità del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II) e come tale ha un ruolo di rilievo durante la risposta immunitaria. La bassa immunogenicità espressa dalle oWJC consolida le motivazioni a favore dell'impiego di queste cellule nei trapianti allogenici.

L'esame del carattere staminale delle oWJC tramite analisi quantitativa in Real Time PCR ha mostrato bassi livelli di espressione del marcatore della pluripotenza OCT4, mentre non è stato rilevato alcun segnale relativo ai trascritti SOX2 e TERT. Invece, merita un commento a se stante la mancata quantificazione del trascritto NANOG. Infatti, a causa di fenomeni degradativi avvenuti durante le manipolazioni del campione non è stato possibile rilevare i livelli di espressione di questo trascritto. Tuttavia, la quantificazione dell'espressione di NANOG registrata nei campioni crioconservati induce a ritenere che la sua espressione fosse presente e quantificabile anche nei campioni di oWJC neoisolate. Questa ipotesi è supportata dal lavoro di Eswari et al. (2016) nel quale è stata dimostrata la presenza del marcatore NANOG proprio nelle oWJC (Eswari et al., 2016).

È interessante notare che da uno studio sull'analisi di un pannello di 78 geni, selezionati sulla base del loro coinvolgimento in attività o proprietà tipiche delle MSC, è emerso che le cellule della matrice cordonale umana (hWJC) presentano bassi livelli di espressione dei marcatori staminali OCT4/POU5F1, SOX2 e TERT (Mechiche Alami et al., 2014). È probabile che i bassi livelli di espressione di questi fattori trascrizionali siano alla base dell'assenza di tumorigenicità riscontrata nelle hWJC (Fong et al., 2010), assenza che rende questo tipo cellulare di particolare valore in occasione di terapie di trapianto e rigenerazione tissutale.

Le informazioni presenti in letteratura mostrano che lo stato di espressione (presente/assente) e i livelli dei trascritti dei marcatori staminali possono variare notevolmente a seconda dell'età della sorgente cellulare e della specie animale. Infatti, analisi condotte su cellule isolate da tessuti extrafetalari hanno riportato che i livelli di espressione dei marcatori staminali si riducono sensibilmente con il progredire della gestazione (Nakajima et al., 2001), (Izumi et al., 2009). Barboni et al. (2014) hanno esaminato le differenze di espressione delle oAEC isolate al principio (<1,5 mese) e al termine (5 mese) della gestazione, riportando un'evidente riduzione nei livelli dei marcatori staminali nelle cellule prelevate dallo stadio di sviluppo tardivo. In particolare tali differenze sono risultate significative per i marcatori SOX2, TERT e NANOG (Barboni et al., 2014). Inoltre, nelle cellule extrafetalari amniotiche di origine ovina (Barboni et al., 2014), umana (Izumi et al., 2009) e murina (Nakajima et al., 2001) è stato osservato che l'attività telomerasica si riduce sensibilmente con il

progredire della gestazione. Tuttavia, l'espressione del mRNA TERT può risultare del tutto assente, come dimostrato nello studio condotto da Miki et al. sulle cellule staminali amniotiche umane prelevate a seguito del parto (Miki et al., 2005).

5.2.3 Capacità differenziativa delle oWJC

Le oWJC hanno mostrato di poter essere indotte al differenziamento adipogenico, osteogenico e neurogenico dopo aver ricevuto gli appropriati stimoli a seguito della somministrazione di terreni di induzione specifici per ciascuna linea.

L'avvenuto differenziamento è stato confermato dalle colorazioni istologiche selettive. Al microscopio ottico le cellule indotte in senso adipogenico hanno mostrato la tipica morfologia associata alle cellule adipose, con la presenza di gocce lipidiche colorate di rosso, mentre l'avvenuto differenziamento verso la linea ossea è stato confermato dalla presenza di depositi minerali di calcio. Sebbene la Società Internazionale di Terapia cellulare (ISCT) prescriva tra i criteri minimi per il riconoscimento delle MSC la verifica della capacità differenziativa in senso mesodermico (Dominici et al., 2006), alcuni lavori hanno dimostrato che le MSC sono in grado di differenziare anche verso le altre due linee germinali (Fong et al., 2010),(Mediano et al., 2015),(Lange-Consiglio et al., 2012). In linea con quanto riportato in questi lavori, il presente studio mostra che le oWJC sono state in grado di differenziare efficientemente anche in senso ectodermico, come evidenziato dalla colorazione istochimica e dalla morfologia neuronale esibita dalle cellule indotte.

La ricerca dell'espressione genica di marcatori associati ai tre fenotipi differenziativi ha confermato il differenziamento in senso adipogenico e osteogenico, rilevando la presenza dei marcatori LPL e PPARG legati alla maturazione delle cellule adipose e dei marcatori COL1A1 e OCN coinvolti nella produzione della matrice ossea extracellulare. Al contrario, nessuno dei due marcatori della linea neuronale, NEFM e NEFL, ha mostrato livelli di espressione tali da poter essere rilevati nelle analisi in Real Time PCR. In accordo con le nostre osservazioni, lo studio di Mediano et al. (2015), condotto sulle MSC ovine del sangue periferico e del midollo osseo, ha riportato che il differenziamento morfologico verso la linea neuronale non è stato accompagnato da una corrispondente espressione dei marcatori linea specifici (Mediano et al., 2015). Le analisi di espressione genica delle cellule differenziate possono rappresentare un valido supporto alle tradizionali colorazioni istochimiche proposte per il riconoscimento delle MSC (Dominici et al., 2006). Tuttavia, l'eterogeneità di specie, di tessuti e di tipologie cellulari, nonché la variabilità soggettiva, rendono complicato stabilire un pannello di marcatori di differenziamento che possa risultare informativo per tutte le MSC. Inoltre,

come detto sopra, i livelli di espressione di alcuni marcatori possono subire una regolazione età-dipendente che aggiunge un ulteriore elemento di variabilità all'identificazione della condizione differenziativa di una cellula. I dati riportati suggeriscono che la conferma molecolare del differenziamento neurogenico richieda l'impiego di marcatori la cui espressione sia costantemente presente e apprezzabile in corrispondenza del processo di differenziamento.

5.2.4 Crioconservazione delle oWJC

Le preparazioni di staminali mesenchimali ad l'uso clinico sono costituite per il 35% da cellule crioconservate (Ikebe and Suzuki, 2014). La procedura di conservazione delle MSC si rende necessaria non solo per preservare le cellule dai rischi connessi con i passaggi seriali della coltura *in vitro*, ma anche per ragioni logistiche dettate dall'aumento esponenziale delle cellule coltivate. Questo è vero soprattutto per le WJC che presentano un'elevata resa all'isolamento e una spiccata capacità proliferativa. Tuttavia, la crioconservazione pone le cellule in una condizione innaturale che genera un forte stress adattativo e può indurre danni severi in grado di influire sul mantenimento delle caratteristiche originali della linea crioconservata. Per tale ragione, i risvolti conseguenti alla sua applicazione necessitano di essere valutati con attenzione sulla base delle esigenze proprie della linea cellulare oggetto di preservazione. Tuttavia, spesso la conservazione delle MSC avviene tramite tecniche sviluppate per altri tipi cellulari, in assenza di un'adeguata ottimizzazione specifica per il tipo cellulare. Infatti, è stato dimostrato che l'efficacia della crioconservazione differisce significativamente sulla base della sorgente tissutale dalle MSC (Davies et al., 2014).

Le tecniche maggiormente adottate nel preservare le MSC sono costituite dal congelamento lento e dalla vitrificazione (Marquez-Curtis et al., 2015). Tuttavia va sottolineato che la mancanza di standardizzazione e l'eterogeneità dei profili termici applicati rende un quadro dispersivo delle attuali conoscenze in questo settore.

In questo contesto trova spazio il nostro studio che, attraverso la realizzazione di tre profili termici dedicati alla conservazione delle oWJC, ha inteso perseguire due obiettivi:

- stabilire il mantenimento delle caratteristiche della coltura primaria nelle cellule crioconservate secondo ciascuna delle condizioni termiche;
- effettuare un confronto tra i tre profili termici al fine di individuare le condizioni più adatte alla conservazione delle oWJC.

5.2.4.1 Vitalità cellulare post crioconservazione

La vitalità cellulare costituisce uno dei principali parametri indagati negli studi cellulari in quanto permette di ottenere una rapida valutazione sullo stato di salute generale del campione (Pegg, 1989).

Nel nostro studio, la valutazione della sopravvivenza cellulare è stata operata tramite due colorazioni mirate ad individuare lo stato di integrità della membrana cellulare: la colorazione con Trypan blue (TB) e la colorazione fluorescente con Ioduro di propidio ed Hoechst (HP).

Sebbene il Trypan blue sia da lungo tempo impiegato nella valutazione della sopravvivenza, alcuni ricercatori ritengono che tale colorante determini una sottostima del numero reale di cellule non vitali presenti nel campione, così da preferire o affiancare nello stesso esperimento un metodo di conta con coloranti fluorescenti (Chan et al., 2015), (Altman et al., 1993), (Mascotti et al., 2000). In occasione di alcuni studi eseguiti in precedenza, anche noi abbiamo rilevato che alcuni campioni cellulari saggiati con il TB mostravano un numero di cellule vitali maggiore del 15 % nei rispetto ai campioni testati con HP.

Nelle oWJC, il confronto dei tassi di sopravvivenza misurati a seguito delle due colorazioni ha mostrato un generale accordo tra i dati ottenuti, ad eccezione delle classi T0_C e T0_R. In queste due classi, il Trypan blue ha mostrato un numero di cellule vitali superiore e significativamente diversa rispetto a quanto riscontrato con la colorazione HP. Tuttavia, la stima con il TB sembra non attendibile. Infatti, i dati riportati a seguito della colorazione Trypan blue possono apparire difficilmente interpretabili in presenza di un elevato danno funzionale alle membrane cellulari. In questi casi, il colorante non è trattenuto nel citosol e la colorazione delle cellule morte appare sbiadita e può condurre ad involontarie false interpretazioni (<http://www.nexcelom.com/Applications/cell-viability-3-comparing-trypan-blue-and-aopi-staining-methods.php>).

Per questo motivo, il maggiore numero di cellule rinvenute con il TB nel gruppo T0_C ha determinato delle differenze non attendibili tra i tre protocolli di crioconservazione (C, L, R) nel confronto interno alla classe T0. Infatti mentre la discrepanza tra il gruppo T0_C e T0_L non è rilevabile con la colorazione con TB, appare, invece, evidente con la colorazione HP, che riporta un numero di cellule vitali significativamente maggiore nel gruppo T0_L rispetto alle altre due classi (Figura 4.7).

Come è noto, a seguito della crioconservazione è frequente osservare una significativa perdita nel numero di cellule vitali recuperate, pari a circa il 20 % (Marquez-Curtis et al., 2015). I valori di vitalità (80,74 %) ottenuti nelle oWJC crioconservate in un sistema controllato con una velocità di

raffreddamento lenta-controllata (1 °C/min), sono in accordo con quanto riportato in letteratura e comunemente accettato. Anche con la crioconservazione classica, operata tramite passaggi seriali del campione in ambienti con temperature progressivamente decrescenti e in assenza di un controllo della velocità di raffreddamento, sono stati ottenuti valori di vitalità elevati (69,12 %), leggermente inferiori rispetto al dato ricavato con metodica lenta-controllata. Contrariamente a quanto ottenuto nei primi due sistemi di crioconservazione (T0_C e T0_L), i valori di vitalità rilevati nella classe T0_R sono risultati estremamente ridotti (<17 %). Questo dato potrebbe essere spiegato dalla combinazione degli effetti dannosi attribuibili alla soluzione crioprotettiva e alla velocità di raffreddamento. Infatti, le alte concentrazioni delle soluzioni di crioconservazione impiegate nel congelamento rapido, in relazione alla loro tossicità, possono esercitare un effetto dannoso che influisce sulla vitalità finale del materiale crioconservato.

Gli effetti della tossicità dei crioprotettori sono ben evidenziati dalle prove di vitalità cellulare condotte dopo la sola esposizione, in assenza di congelamento, e confrontate con il campione controllo in terreno base di coltura (CTR1). La percentuale di cellule vitali nella soluzione con 10% di DMSO non ha mostrato differenze significative rispetto al CTR1, mentre l'esposizione alla soluzione con 15 % DMSO + 15 % EG ha presentato un numero di cellule vitali significativamente inferiore (circa 25-30 % in meno) rispetto al CTR1.

Questo dato mette in evidenza che la riduzione complessiva della vitalità rilevata al termine del protocollo rapido (T0_R) potrebbe essere attribuita all'insorgenza di fenomeni di citotossicità dovuti ai CPA, oppure all'insufficiente velocità di raffreddamento raggiunta nel sistema di congelamento rapido. Infatti, i fattori che intervengono nel determinare il successo di un'efficace procedura di congelamento sono tre: la concentrazione dei crioprotettori, la velocità di raffreddamento e il volume del campione. Solo l'equilibrio tra questi tre fattori può assicurare la riuscita della crioconservazione. La realizzazione dello stato vetroso tipico della vitrificazione può essere ottenuto esclusivamente dalla combinazione di elevate concentrazioni di CPA, velocità di congelamento estremamente rapide (>10000 °C/min) e piccoli volumi di campione. Spesso, invece, si presta maggiore attenzione ai primi due parametri e si sottovaluta l'importanza del volume del campione. Tuttavia, la riduzione del volume permette l'aumento della velocità di raffreddamento e l'impiego di minori concentrazioni di crioprotettori (Zhang et al., 2011). Durante il corso di una precedente sperimentazione abbiamo potuto osservare in prima persona questo fenomeno. Infatti, piccole gocce di soluzioni di vitrificazione (0,5 - 1 µl), deposte su vetrini coprioggetto e raffreddate per immersione diretta in LN₂, apparivano trasparenti oppure opache come conseguenza del successo

o insuccesso della vitrificazione. Minime variazioni nella deposizione del volume del campione determinavano la perdita della potenzialità vitrificante del sistema. A questo proposito, appare chiaro che l'immersione diretta di 200 µl di campione in LN₂ eseguita nel corso del sistema rapido (R), non è stata in grado di garantire la realizzazione di velocità di discesa termica comparabili con quelle dei protocolli convenzionali di vitrificazione. Questo probabilmente ha determinato degli eventi di formazione del ghiaccio intra ed extracellulare, che non è stato possibile contrastare con l'elevata concentrazione dei CPA presenti nella soluzione. L'impiego di miscele complesse composte da CPA permeanti, come DMSO e EG, e non permeanti, quali zuccheri e polimeri, è pratica comune nella vitrificazione. Il PVA è un polimero a basso peso molecolare che durante la vitrificazione svolge il ruolo di agente bloccante, in quanto capace di inibire la formazione e la crescita dei cristalli di ghiaccio, prevenendo anche i fenomeni di ricristallizzazione (Wowk, 2015). Tuttavia, la sua efficacia protettiva è subordinata al bilanciamento dei tre parametri del sistema di crioconservazione, che non è stato realizzato nella metodica del sistema R. Appaiono, quindi, improbabili alcuni risultati presenti in letteratura che riportano percentuali di vitalità pari al 95 % in MSC ovine e hWJC vitrificate attraverso l'immersione diretta in LN₂ di grandi volumi (fino a 500 µl) di sospensione cellulare (Wang et al., 2011),(Kaviani et al., 2014),(Massood et al., 2013). L'elevata percentuale di vitalità riportata nei lavori citati risulta in contrasto con il principio basilare della vitrificazione. Inoltre, questi studi sostengono di aver osservato la formazione di una vera e propria matrice vetrosa. Nel nostro esperimento di congelamento rapido non è stata osservata alcuna struttura vetrosa all'interno delle paillettes immerse in LN₂.

Nonostante la riduzione della vitalità registrata al T0, le analisi di sopravvivenza condotte dopo 48 ore di coltura in vitro post scongelamento hanno mostrato percentuali di vitalità elevate (96-100 %) per ciascuno dei tre sistemi esaminati, suggerendo che le cellule hanno tratto giovamento dal periodo di coltura successivo alla crioconservazione.

5.2.4.2 Caratterizzazione, multipotenza e capacità differenziativa delle oWJC crioconservate

L'esame delle cellule pre e post crioconservazione sembra mostrare che questo processo non determini la perdita delle caratteristiche staminali o differenziative delle MSC (Yong et al., 2015), (Janz Fde et al., 2012); anzi, nelle cellule staminali adipose umane crioconservate è stato riportato un aumento nei livelli di espressione dei marcatori staminali OCT4, SOX2 e NANOG (Yong et al., 2015). Inoltre, i livelli dei marcatori staminali, la capacità differenziativa e la riparazione tissutale

appaiono di maggiore entità nelle WJC rispetto alle MSC di altre origini extrafetali (Somal et al., 2017).

Tuttavia, non esiste una relazione diretta tra i livelli di espressione dei marcatori staminali e la capacità proliferativa o differenziativa. Pierantozzi riporta che, analizzando la presenza dei fattori NANOG, OCT4 e SOX2, nelle hMSC del tessuto adiposo, del cuore e del midollo osseo, ha osservato che solo il fattore *NANOG* risultava espresso nelle cellule proliferanti in coltura, ma lo stesso risultava assente nelle cellule neo isolate. Inoltre, il numero di cellule esprimenti *NANOG* non appariva associato alla capacità proliferativa o differenziativa delle popolazioni MSC. L'attivazione dell'espressione di *NANOG* è stata proposta come una condizione associata al passaggio dallo stato quiescente *in vivo* all'adattamento di crescita *in vitro* (Pierantozzi et al., 2011).

Le analisi molecolari delle oWJC post scongelamento, eseguite al T0 e al T48, hanno mostrato che il trascritto *NANOG* era presente con bassi livelli nei campioni appena scongelati, mentre i livelli del trascritto sono apparsi prossimi al limite di rilevamento della Real Time PCR per i campioni T48 di ciascuno dei tre sistemi di crioconservazione. Purtroppo, la mancata quantificazione del trascritto *NANOG* nei campioni controllo ha impedito di eseguire un confronto con i livelli di espressione riscontrati nei campioni post scongelamento. Questa condizione, anche a causa del ridotto numero di replicati biologici analizzati, pone la necessità di riconsiderare in futuro l'analisi di questo marcatore. A seguito della crioconservazione con i tre sistemi, le cellule cordonali crioconservate hanno mostrato livelli di espressione di *OCT4* comparabili con il gruppo controllo. Inoltre, è stata confermata l'assenza dei trascritti *SOX2* e *TERT* osservata nelle cellule controllo non crioconservate. Anche l'assetto di espressione dei marcatori di superficie ($CD29^+$, $CD34^-$, $CD74^-$) è apparso invariato. L'analisi della capacità differenziativa post scongelamento è stata realizzata esclusivamente nei campioni del protocollo classico (C) e lento-controllato (L). Le cellule del gruppo rapido sono state escluse dalle analisi in ragione del insufficiente numero di cellule rinvenuto a seguito dello scongelamento.

Il differenziamento osteogenico è stato confermato a livello molecolare e istochimico sia nei campioni C sia in quelli L.

L'espressione dei marcatori adiposi è stata rinvenuta in entrambi i gruppi di crioconservazione, ma solo il sistema lento-controllato ha mostrato un debole segnale positivo alla colorazione istochimica. Inoltre, entrambi i gruppi di crioconservazione non hanno mostrato espressione dei marcatori NEFM e NEFL, come già osservato nei campioni controllo. Comunque, entro le colture di differenziamento neurogeniche è stata osservata la presenza di alcune cellule con morfologia simil-neuronale (Figura

4.11). Queste cellule rappresentavano però una minoranza delle cellule indotte e questo non ci permette di affermare che il differenziamento neurogenico sia avvenuto con successo. Fong et al. (2010) riportano che, a seguito dell'induzione di hWJC verso la linea nervosa, il 40-50 % delle cellule indotte esibiva una morfologia neuronale (Fong et al., 2010). Tuttavia, lo stesso lavoro sottolinea che i cambiamenti morfologici sono stati evidenti non prima del settimo giorno di induzione (Fong et al., 2010). È quindi possibile che il differenziamento neurogenico delle oWJC crioconservate potesse necessitare di tempi di induzione maggiori per esprimere il fenotipo neuronale, contrariamente al breve tempo (7 giorni) sufficiente per le corrispondenti cellule controllo.

Riassumendo, i dati di caratterizzazione, pluripotenza e capacità differenziativa osservati nei gruppi classico e lento-controllato non hanno mostrato differenze significative negli esiti ottenuti dalle cellule crioconservate con le due metodiche.

5.2.5 Conclusioni sulle oWJC

Il presente lavoro riporta che le MSC sono state isolate con successo dalla matrice cordonale ovina. Queste cellule caratteristiche di elevata proliferità, staminalità e capacità differenziativa simili a quelle osservate nella specie umana (Fong et al., 2015) e bovina (Lange-Consiglio et al., 2017).

La gelatina di Wharton ovina ha mostrato di essere una sorgente attendibile, abbondante e non invasiva cellule staminali mesenchimali. La crioconservazione di questo tipo cellulare ha determinato una riduzione della vitalità variabile a seconda della tecnica impiegata, che è risultata di minore entità a seguito dell'adozione di un protocollo con discesa termica lenta e controllata (1 °C/min). Al contrario, l'esposizione delle oWJC a concentrazioni elevate di crioprotettori e la realizzazione di una metodica rapida di crioconservazione hanno alterato sensibilmente la capacità vitale di queste cellule, impedendone il loro impiego per analisi o applicazioni successive. I risultati delle analisi molecolari post scongelamento non hanno evidenziato alterazioni nelle caratteristiche antigeniche e di pluripotenza. Tuttavia, la capacità differenziativa dei campioni crioconservati è apparsa alterata rispetto a quanto osservato nelle cellule neo isolate e solo il differenziamento verso la linea ossea può considerarsi realizzato. Appaiono necessarie ulteriori indagini per ampliare la caratterizzazione di questo tipo cellulare. In particolare, la selezione di un pannello più ampio di marcatori linea-specifici e la valutazione dei loro livelli di espressione potrebbero essere utili per comprendere le dinamiche temporali coinvolte nel processo di differenziamento.

5.3 SEME OVINO

Ad oggi, la tecnica maggiormente impiegata per la conservazione delle risorse genetiche di un gran numero di specie è rappresentata dalla crioconservazione. Tuttavia, questa pratica presenta diversi inconvenienti legati all'azoto liquido, alla sicurezza del suo impiego per operatori e materiali conservati, ai costi di realizzazione e di mantenimento, agli spazi e alla specializzazione professionale richiesta. Prendendo in considerazione questi aspetti abbiamo deciso di esplorare l'impiego di una tecnica che potrebbe affermarsi come alternativa competitiva nella conservazione del gamete maschile: la liofilizzazione o freeze-dryng (FD). La riduzione degli spazi e dei costi richiesti e la possibilità di conservare il materiale liofilizzato a temperature sopra lo zero (4 °C o temperatura ambiente) rappresentano i principali punti di forza di questa tecnica. Ciò nonostante, la liofilizzazione sottopone i campioni ad uno stress rilevante per effetto dell'innaturale essiccazione delle strutture biologiche e della formazione di cristalli di ghiaccio. Queste condizioni determinano la perdita dell'integrità di membrana e della motilità, oltre che possibili danni alla struttura cromatinica in conseguenza dell'azione di endonucleasi e della formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). La costruzione dei protocolli di FD ha quindi lo scopo di proporre delle strategie per contrastare i fattori che influiscono sull'efficacia della metodica. Il controllo può essere operato principalmente attraverso la modulazione della composizione delle soluzioni di liofilizzazione, dei valori di temperatura e di pressione di vuoto applicati. Inoltre, è stato osservato che il tempo e la temperatura di conservazione del prodotto essiccato e la procedura di reidratazione possono rappresentare delle fasi in grado di influire sull'efficacia finale della metodica. Ad oggi, diversi lavori presentano come dato accertato e accettato la perdita di motilità e di integrità strutturale delle cellule liofilizzate. I principali tentativi di miglioramento sono rivolti alla preservazione dell'integrità del filamento di DNA. Infatti, è stato dimostrato che, in presenza di integrità nucleare, la capacità fertilizzante che in natura è necessariamente subordinata al possesso di una motilità completa e progressiva, possa essere mantenuta con l'ausilio della metodica dell'ICSI (Kaneko et al., 2014), (Patrick et al., 2017). Tuttavia, il mantenimento della struttura e della funzionalità fisiologica del gamete consentirebbe di eliminare il passaggio laborioso e delicato rappresentato dall'iniezione intracitoplasmatica.

Riguardo a questa possibilità, per superare i danni generati dalla formazione del ghiaccio e dall'essiccazione spinta tipici del FD, ci siamo proposti di esplorare l'idea che una procedura di liofilizzazione parziale (PFD) possa rispondere in maniera adeguata alla soddisfazione di questa esigenza.

I fattori sui quali abbiamo indirizzato il nostro intervento sono rappresentati dalla composizione delle soluzioni di liofilizzazione, dalla temperatura di raffreddamento e dalla velocità di sublimazione. Il bilanciamento di questi elementi ha permesso di realizzare un PFD che ha dimostrato di favorire la formazione di ampi spazi di frazione liquida non cristallizzata (UF), indispensabili per l'alloggiamento delle strutture cellulari e la riduzione della compressione meccanica esercitata dalla crescita dei cristalli. Infatti, è noto che, durante il processo di formazione di una matrice cristallina, gli elementi cellulari si dispongono nei canali di soluzione non congelata che si creano tra i cristalli di ghiaccio e che il diametro di questi canali si riduce con il diminuire della temperatura (Mazur and Rigopoulos, 1983). In particolare, abbiamo esplorato la capacità protettiva esercitata da due soluzioni di liofilizzazione, Lyo A e Lyo B, realizzate con tuorlo d'uovo, Tris e proporzioni diverse di trealosio (0,25 M vs 0,16 M) e sorbitolo (0,4 M vs 0,26 M). Queste due molecole assolvono al ruolo di conferire protezione alle membrane cellulari durante il congelamento e sono impiegati come alternativa ai canonici crioprotettori permeanti. Il trealosio è un disaccaride non riducente che stabilizza le proteine e la membrana cellulare, la quale normalmente costituisce una barriera alla sua penetrazione nel compartimento intracellulare. D'altro canto alcuni studi mostrano che la sua efficacia crioprotettiva può essere assoluta sia nella sua localizzazione extracellulare (Erdag et al., 2002) sia a seguito della somministrazione artificiale all'interno della cellula (Eroglu et al., 2000). Inoltre, nella preservazione del seme murino, è stata dimostrata la sua migliore capacità crioprotettiva rispetto ad alcuni CPA permeanti quali DMSO, EG e glicerolo (Sztein et al., 2001). È interessante notare che l'azione protettiva del trealosio si manifesta anche in conseguenza di procedure di essiccazione in assenza di congelamento, come mostrato nel seme murino sottoposto ad una parziale disidratazione in azoto secco per 5 minuti (McGinnis et al., 2005). Invece, il sorbitolo è un alcol a 6 atomi di carbonio derivato dal glucosio, in grado di interagire con i fosfolipidi di membrana, determinando un aumento nel rapporto tra acidi grassi insaturi e saturi che si manifesta con una maggiore fluidità e permeabilità della membrana, la quale quindi è in grado di adattarsi meglio alle condizioni del congelamento (Coulibaly et al., 2010). In conseguenza del processo di PFD, la soluzione di liofilizzazione Lyo B, contenente minori concentrazioni dei due crioprotettori, ha dimostrato di poter garantire una maggiore vitalità e motilità del seme ovino ($8 \pm 1,2\%$) rispetto alla soluzione Lyo A ($6,5 \pm 2\%$). All'analisi in criomicroscopia, le due soluzioni hanno mostrato una differente distribuzione del rapporto tra struttura cristallina e la quantità di UF. In particolare, a seguito del PFD, la porzione della frazione non cristallizzata è risultata superiore nei campioni liofilizzati impiegando la soluzione Lyo B. Inoltre,

le immagini raccolte al criomicroscopio hanno rivelato che, per la medesima soluzione, i campioni liofilizzati hanno mostrato una quantità di UF notevolmente superiore rispetto ai campioni non PFD. Le analisi al microscopio elettronico a scansione ambientale (ESEM) hanno permesso di approfondire la comprensione dell'architettura tridimensionale del campione, conservandone la naturale morfologia. Infatti, l'ESEM costituisce uno dei più recenti sviluppi della microscopia elettronica che permette di visualizzare materiali estremamente delicati, con alto grado di idratazione e non conduttivi (Stokes, 2003). Risulta quindi un valido strumento per l'analisi dei campioni biologici (Kirk et al., 2009). Inoltre, non richiede le laboriose procedure preanalitiche di fissazione o disidratazione che sarebbero necessarie per le analisi con il SEM tradizionale. Il controllo dinamico dei parametri di pressione, temperatura e umidità è utile per modulare le condizioni operative sulla base della natura del materiale. Nell'ESEM è stato possibile ricreare le condizioni necessarie per la parziale liofilizzazione: i campioni Lyo B sono stati posizionati sopra la cella termostata raffreddata a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e sottoposti ad una condizione di basso vuoto (75 mTorr). Il confronto tra il campione liofilizzato e quello congelato mantenuto a pressione atmosferica ha mostrato che la struttura dei campioni Lyo B liofilizzati appariva meno densa e ricca di cavità rispetto alla struttura più compatta mostrata dalla stessa soluzione esclusivamente congelata (Figura 4.14). Ad oggi, questo lavoro rappresenta la prima indagine condotta con l'ESEM rivolta allo studio dell'architettura 3D di soluzioni biologiche parzialmente liofilizzate.

La realizzazione di un'efficace procedura di PFD è stata possibile attraverso l'impiego di uno strumento di nuova realizzazione, chiamato Darya, che ha permesso di operare con una pressione di vuoto superiore ($80\text{ mTorr} = 0,10\text{ mbar}$) rispetto valori impiegati nel FD convenzionale ($\leq 40\text{ mTorr} = 0,053\text{ mbar}$) (Olaciregui and Gil, 2017). Attraverso la combinazione tra la pressione di vuoto e la temperatura di raffreddamento di $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ è stato possibile regolare la cinetica e l'intensità dell'essiccazione ottenendo una rapida velocità di sublimazione. Infatti, il danno generato dalla formazione dei cristalli di ghiaccio può essere limitato dalla rapida sublimazione degli stessi.

Il presente lavoro costituisce uno studio preliminare dei meccanismi di base della procedura di liofilizzazione parziale. Le analisi sono state focalizzate principalmente sulla valutazione degli aspetti chimici legati alla composizione delle soluzioni di liofilizzazione e di quelli fisici legati alla formazione del ghiaccio e della frazione non cristallizzata. Il parametro biologico della motilità cellulare necessita di essere integrato da ulteriori indagini che vadano a valutare l'integrità del genoma e la capacità fertilizzante del seme ovino congelato.

Tuttavia, i dati riportati mostrano che le funzionalità motoria delle cellule spermatiche può essere conservata attraverso la procedura della liofilizzazione parziale. I risultati ottenuti incoraggiano a pensare che siano realizzabili ulteriori miglioramenti. La modulazione dei parametri operativi, quali temperatura e pressione di vuoto, richiede studi aggiuntivi al fine di proporre delle strategie di PFD sempre più efficaci. Tuttavia, in considerazione della natura preliminare dello studio e in vista di ulteriori miglioramenti della tecnica, possiamo affermare che la metodica del partial freeze-drying potrebbe rappresentare una valida alternativa in grado di consentire la conservazione del materiale seminale riducendo sensibilmente gli inconvenienti insiti nelle procedure di liofilizzazione convenzionali.

6 CONCLUSIONI GENERALI

La crioconservazione è un insieme di tecniche complesso che, nonostante un'estesa mole di studi sul tema, costituisce un campo d'indagine attivo e in continua evoluzione, al quale si aggiungono costantemente piccoli ma significativi elementi di sviluppo che alimentano il suo carattere innovativo.

Le variabili in termini di gestione del processo ed efficienza della metodica presentano una serie esponenziale di quesiti ai quali si cerca di dare risposta intervenendo sugli aspetti operativi primari quali, per citarne alcuni, densità cellulare, volume del campione, velocità di variazione termica, composizione chimica delle soluzioni e dispositivi di crioconservazione. Le possibilità d'intervento e le combinazioni risultanti sono molteplici.

Sebbene per alcuni tipi cellulari siano stati definiti dei parametri operativi in grado di assicurare una discreta efficienza della crioconservazione, la condizione ideale, secondo la quale la sopravvivenza e la funzionalità di qualsiasi cellula possono essere conservate inalterate, appare ancora oggi un obiettivo irrealizzato.

Questo fatto può essere spiegato prendendo in esame tre prospettive:

1) dal punto di vista operativo, la difficoltà di ottenere una visione d'insieme della crioconservazione appare una conseguenza dell'imprescindibile natura dinamica del processo, che rende complesso individuare ed intervenire su tutti gli elementi coinvolti nel mantenimento del delicato equilibrio di un sistema criobiologico e sulle loro reciproche relazioni nel tempo;

2) dal punto di vista biologico, la sensibilità specifica insita nella tipologia cellulare richiede che le condizioni di crioconservazione siano progettate sulla base della natura del campione, implicando che il successo ottenuto nella definizione di un protocollo termico per un dato tipo cellulare difficilmente possa presentare la stessa efficienza quando applicato su una cellula differente;

3) dal punto di vista analitico, l'assenza di una standardizzazione nelle metodiche di analisi tese a valutare l'efficacia della tecnica ostacola la comprensione dei fenomeni originati dalla crioconservazione e inoltre rende complesso il confronto inter-laboratorio dei risultati ottenuti.

Il presente lavoro di tesi, tenendo conto della complessità dell'argomento trattato, ha cercato di prendere in considerazione questi aspetti e di rispondere ad alcune delle problematiche sopra menzionate tramite l'adozione di criteri operativi ed analitici calibrati sulla base delle caratteristiche

del tipo cellulare analizzato. La sensibilità cellulo - specifica emersa dai risultati raccolti suggerisce che il miglioramento delle pratiche di crioconservazione potrebbe beneficiare dell'adozione di un approccio ancora più mirato.

Infatti, la tendenza generale delle nuove rotte della ricerca è indirizzata verso una crescente personalizzazione dei trattamenti, secondo la cosiddetta medicina di precisione. La crioconservazione, quale metodica propedeutica sia nella ricerca di base sia nella pratica clinica, si inserisce a pieno titolo nel contesto delle scienze da indirizzare verso l'individualità del soggetto, in campo umano così come in campo veterinario.

Lo sviluppo di un sistema personalizzato richiederà nei tempi futuri un approccio multidisciplinare realizzato con l'impiego di metodologie e piattaforme diversificate capaci di integrare tra loro i dati morfologici, funzionali e molecolari.

A questo proposito, le scienze omiche dei processi biochimici, metabolici, genetici ed epigenetici rappresenteranno degli alleati decisivi nello sviluppo delle future tecniche di crioconservazione.

Bibliografia:

- Acker, J. (2015). 23. Innocuous intracellular ice formation: Ice growth in complex systems. *Cryobiology* 71, 171.
- Acker, J.P., and McGann, L.E. (2002). Innocuous intracellular ice improves survival of frozen cells. *Cell Transplant* 11, 563-571.
- Acker, J.P., and McGann, L.E. (2003). Protective effect of intracellular ice during freezing? *Cryobiology* 46, 197-202.
- Alexander-Bridges, M., Dugast, I., Ercolani, L., Kong, X.F., Giere, L., and Nasrin, N. (1992). Multiple insulin-responsive elements regulate transcription of the GAPDH gene. *Adv Enzyme Regul* 32, 149-159.
- Altman, S.A., Randers, L., and Rao, G. (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog* 9, 671-674.
- Asghar, W., El Assal, R., Shafiee, H., Anchan, R.M., and Demirci, U. (2014). Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnol J* 9, 895-903.
- Ashwood-Smith, M.J., and Friedmann, G.B. (1979). Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time, and x-irradiation on mammalian cells preserved at -196 degrees in dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 16, 132-140.
- Bakhach, J. (2009). The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis* 5, 119-126.
- Barboni, B., Russo, V., Curini, V., Martelli, A., Berardinelli, P., Mauro, A., Mattioli, M., Marchisio, M., Bonassi Signoroni, P., Parolini, O., *et al.* (2014). Gestational stage affects amniotic epithelial cells phenotype, methylation status, immunomodulatory and stemness properties. *Stem Cell Rev* 10, 725-741.
- Baust, J.G., Gao, D., and Baust, J.M. (2009). Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis* 5, 90-96.
- Ben-David, U., Mayshar, Y., and Benvenisty, N. (2011). Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. *Cell Stem Cell* 9, 97-102.
- Berlinguer, F., Leoni, G.G., Bogliolo, L., Bebbere, D., Succu, S., Rosati, I., Ledda, S., and Naitana, S. (2005). In vivo and in vitro fertilizing capacity of cryopreserved European mouflon [*Ovis gmelini musimon*] spermatozoa used to restore genetically rare and isolated populations. *Theriogenology* 63, 902-911.
- Birmingham, E., Niebur, G.L., McHugh, P.E., Shaw, G., Barry, F.P., and McNamara, L.M. (2012). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater* 23, 13-27.
- Bogliolo, L., Murrone, O., Piccinini, M., Ariu, F., Ledda, S., Tilocca, S., and Albertini, D.F. (2015). Evaluation of the impact of vitrification on the actin cytoskeleton of in vitro matured ovine oocytes by means of Raman microspectroscopy. *J Assist Reprod Genet* 32, 185-193.
- Bongso, A., and Fong, C.Y. (2013). The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Rev* 9, 226-240.
- Borderie, V.M., Lopez, M., Lombet, A., Carvajal-Gonzalez, S., Cywiner, C., and Laroche, L. (1998). Cryopreservation and culture of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 1511-1519.
- Brevini, T.A., Pennarossa, G., Acocella, F., Brizzola, S., Zenobi, A., and Gandolfi, F. (2016). Epigenetic conversion of adult dog skin fibroblasts into insulin-secreting cells. *Vet J* 211, 52-56.
- Bruinsma, B.G., Berendsen, T.A., Izamis, M.L., Yeh, H., Yarmush, M.L., and Uygun, K. (2015). Supercooling preservation and transplantation of the rat liver. *Nat Protoc* 10, 484-494.
- Byun, K., Kim, T.K., Oh, J., Bayarsaikhan, E., Kim, D., Lee, M.Y., Pack, C.G., Hwang, D., and Lee, B. (2013). Heat shock instructs hESCs to exit from the self-renewal program through negative regulation of OCT4 by SAPK/JNK and HSF1 pathway. *Stem Cell Res* 11, 1323-1334.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650.
- Cetinkaya, G., and Arat, S. (2011). Cryopreservation of cartilage cell and tissue for biobanking. *Cryobiology* 63, 292-297.

- Chan, L.L.-Y., Kuksin, D., Lavery, D.J., Saldi, S., and Qiu, J. (2015). Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method. *Cytotechnology* 67, 461-473.
- Chatterjee, A., Saha, D., Niemann, H., Gryshkov, O., Glasmacher, B., and Hofmann, N. (2017). Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. *Cryobiology* 74, 1-7.
- Choi, J., and Bischof, J.C. (2011). Cooling rate dependent biophysical and viability response shift with attachment state in human dermal fibroblast cells. *Cryobiology* 63, 285-291.
- Cobo, A., and Diaz, C. (2011). Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* 96, 277-285.
- Colell, A., Green, D.R., and Ricci, J.E. (2009). Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ* 16, 1573-1581.
- Cooper, S.M., and Dawber, R.P. (2001). The history of cryosurgery. *J R Soc Med* 94, 196-201.
- Coulibaly, I., Dubois-Dauphin, R., Destain, J., Fauconnier, M.L., Lognay, G., and Thonart, P. (2010). The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. *Int J Microbiol* 2010, 625239.
- Czernik, M., Fidanza, A., Sardi, M., Galli, C., Brunetti, D., Malatesta, D., Della Salda, L., Matsukawa, K., Ptak, G.E., and Loi, P. (2013). Differentiation potential and GFP labeling of sheep bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 114, 134-143.
- Da-Croce, L., Gambarini-Paiva, G.H., Angelo, P.C., Bambirra, E.A., Cabral, A.C., and Godard, A.L. (2013). Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues. *Cell Tissue Bank* 14, 65-76.
- Davies, O.G., Smith, A.J., Cooper, P.R., Shelton, R.M., and Scheven, B.A. (2014). The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology* 69, 342-347.
- Dhali, A., Anchamparuthy, V.M., Butler, S.P., Pearson, R.E., Mullarky, I.K., and Gwazdauskas, F.C. (2009). Effect of droplet vitrification on development competence, actin cytoskeletal integrity and gene expression in in vitro cultured mouse embryos. *Theriogenology* 71, 1408-1416.
- Diller, K.R., and Cravalho, E.G. (1970). A cryomicroscope for the study of freezing and thawing processes in biological cells. *Cryobiology* 7, 191-199.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Enerback, S., Ohlsson, B.G., Samuelsson, L., and Bjursell, G. (1992). Characterization of the human lipoprotein lipase (LPL) promoter: evidence of two cis-regulatory regions, LP-alpha and LP-beta, of importance for the differentiation-linked induction of the LPL gene during adipogenesis. *Mol Cell Biol* 12, 4622-4633.
- Erdag, G., Eroglu, A., Morgan, J., and Toner, M. (2002). Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose. *Cryobiology* 44, 218-228.
- Eroglu, A., Russo, M.J., Bieganski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H., and Toner, M. (2000). Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat Biotechnol* 18, 163-167.
- Eswari, S., Monisha, M., Vijayarani, K., and Kumanan, K. (2016). Expression of early transcription factors by mesenchymal stem cells derived from ovine umbilical cord Wharton's jelly. *The Indian Journal of Animal Sciences*; Vol 86, No 10 (2016).
- Fahy, G.M., Wowk, B., Wu, J., Phan, J., Rasch, C., Chang, A., and Zendejas, E. (2004). Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology* 48, 157-178.
- Fatimah, S.S., Ng, S.L., Chua, K.H., Hayati, A.R., Tan, A.E., and Tan, G.C. (2010). Value of human amniotic epithelial cells in tissue engineering for cornea. *Hum Cell* 23, 141-151.
- Feng, R., and Wen, J. (2015). Overview of the roles of Sox2 in stem cell and development. *Biol Chem* 396, 883-891.
- Fong, C.Y., Subramanian, A., Biswas, A., and Bongso, A. (2015). Freezing of Fresh Wharton's Jelly From Human Umbilical Cords Yields High Post-Thaw Mesenchymal Stem Cell Numbers for Cell-Based Therapies. *J Cell Biochem*.
- Fong, C.Y., Subramanian, A., Biswas, A., Gauthaman, K., Srikanth, P., Hande, M.P., and Bongso, A. (2010). Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells. *Reprod Biomed Online* 21, 391-401.

- Forriol, F., Longo, U.G., Alvarez, E., Campi, S., Ripalda, P., Rabitti, C., Maffulli, N., and Denaro, V. (2011). Scanty integration of osteochondral allografts cryopreserved at low temperatures with dimethyl sulfoxide. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* *19*, 1184-1191.
- Freimark, D., Sehl, C., Weber, C., Hudel, K., Czermak, P., Hofmann, N., Spindler, R., and Glasmacher, B. (2011). Systematic parameter optimization of a Me(2)SO- and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells. *Cryobiology* *63*, 67-75.
- Gage, A.A., and Baust, J.G. (2007). Cryosurgery for tumors. *J Am Coll Surg* *205*, 342-356.
- Gianaroli, L., Magli, M.C., Stanghellini, I., Crippa, A., Crivello, A.M., Pescatori, E.S., and Ferraretti, A.P. (2012). DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. *Fertil Steril* *97*, 1067-1073.e1061.
- Gil, L., Olaciregui, M., Luno, V., Malo, C., Gonzalez, N., and Martinez, F. (2014). Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm. *Reprod Domest Anim* *49 Suppl 4*, 72-81.
- Graven, K.K., Yu, Q., Pan, D., Roncarati, J.S., and Farber, H.W. (1999). Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta* *1447*, 208-218.
- Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., and Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* *11*, 73-88.
- He, X. (2011). Thermostability of biological systems: fundamentals, challenges, and quantification. *Open Biomed Eng J* *5*, 47-73.
- Heidari, B., Shirazi, A., Akhondi, M.M., Hassanpour, H., Behzadi, B., Naderi, M.M., Sarvari, A., and Borjian, S. (2013). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. *Avicenna J Med Biotechnol* *5*, 104-117.
- Hing, K.A. (2004). Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* *362*, 2821-2850.
- Hiyama, E., and Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer* *96*, 1020-1024.
- Hlubocky, J., Mokracek, A., Novacek, V., Vojacek, J., Burkert, J., Kochova, P., Klepacek, J., Pepper, J., and Spatenka, J. (2011). Mechanical properties of mitral allografts are not reasonably influenced by cryopreservation in sheep model. *Physiol Res* *60*, 475-482.
- Ho, A.D., Wagner, W., and Franke, W. (2008). Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* *10*, 320-330.
- Iacono, E., Brunori, L., Pirrone, A., Pagliaro, P.P., Ricci, F., Tazzari, P.L., and Merlo, B. (2012). Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction* *143*, 455-468.
- Ikebe, C., and Suzuki, K. (2014). Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res Int* *2014*, 951512.
- Ishitani, R., and Chuang, D.M. (1996). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antisense oligodeoxynucleotides protect against cytosine arabinonucleoside-induced apoptosis in cultured cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 9937-9941.
- Ishitani, R., Sunaga, K., Hirano, A., Saunders, P., Katsube, N., and Chuang, D.M. (1996). Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture. *J Neurochem* *66*, 928-935.
- Iv Santaliz-Ruiz, L.E., Xie, X., Old, M., Teknos, T.N., and Pan, Q. (2014). Emerging role of nanog in tumorigenesis and cancer stem cells. *Int J Cancer* *135*, 2741-2748.
- Izumi, M., Pazin, B.J., Minervini, C.F., Gerlach, J., Ross, M.A., Stolz, D.B., Turner, M.E., Thompson, R.L., and Miki, T. (2009). Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion. *J Reprod Immunol* *81*, 39-43.
- Jager, M., Ott, C.E., Grunhagen, J., Hecht, J., Schell, H., Mundlos, S., Duda, G.N., Robinson, P.N., and Lienau, J. (2011). Composite transcriptome assembly of RNA-seq data in a sheep model for delayed bone healing. *BMC Genomics* *12*, 158.
- Janz Fde, L., Debes Ade, A., Cavaglieri Rde, C., Duarte, S.A., Romao, C.M., Moron, A.F., Zugaib, M., and Bydlowski, S.P. (2012). Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. *J Biomed Biotechnol* *2012*, 649353.

- Jez, M., Ambady, S., Kashpur, O., Grella, A., Malcuit, C., Vilner, L., Rozman, P., and Dominko, T. (2014). Expression and differentiation between OCT4A and its Pseudogenes in human ESCs and differentiated adult somatic cells. *PLoS One* *9*, e89546.
- Ji, L., de Pablo, J.J., and Palecek, S.P. (2004). Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells. *Biotechnol Bioeng* *88*, 299-312.
- Kaneko, T., Ito, H., Sakamoto, H., Onuma, M., and Inoue-Murayama, M. (2014). Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PLoS One* *9*, e113381.
- Karimi-Busheri, F., Zadorozhny, V., Carrier, E., and Fakhrai, H. (2013). Molecular integrity and global gene expression of breast and lung cancer stem cells under long-term storage and recovery. *Cell Tissue Bank* *14*, 175-186.
- Kaviani, M., Ezzatabadipour, M., Nematollahi-Mahani, S.N., Salehinejad, P., Mohammadi, M., Kalantar, S.M., and Motamedi, B. (2014). Evaluation of gametogenic potential of vitrified human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal cells. *Cytotherapy* *16*, 203-212.
- Kearney, J.N. (1991). Cryopreservation of cultured skin cells. *Burns* *17*, 380-383.
- Kirk, S.E., Skepper, J.N., and Donald, A.M. (2009). Application of environmental scanning electron microscopy to determine biological surface structure. *J Microsc* *233*, 205-224.
- Kollmer, M., Buhrman, J.S., Zhang, Y., and Gemeinhart, R.A. (2013). Markers Are Shared Between Adipogenic and Osteogenic Differentiated Mesenchymal Stem Cells. *J Dev Biol Tissue Eng* *5*, 18-25.
- Lange-Consiglio, A., Corradetti, B., Bizzaro, D., Magatti, M., Ressel, L., Tassan, S., Parolini, O., and Cremonesi, F. (2012). Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. *J Tissue Eng Regen Med* *6*, 622-635.
- Lange-Consiglio, A., Perrini, C., Bertero, A., Esposti, P., Cremonesi, F., and Vincenti, L. (2017). Isolation, molecular characterization, and in vitro differentiation of bovine Wharton jelly-derived multipotent mesenchymal cells. *Theriogenology* *89*, 338-347.
- Lefterova, M.I., and Lazar, M.A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* *20*, 107-114.
- Leon-Quinto, T., Simon, M.A., Cadenas, R., Martinez, A., and Serna, A. (2014). Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Cryobiology* *68*, 227-233.
- Liu, K., Yang, Y., and Mansbridge, J. (2000). Comparison of the stress response to cryopreservation in monolayer and three-dimensional human fibroblast cultures: stress proteins, MAP kinases, and growth factor gene expression. *Tissue Eng* *6*, 539-554.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* *25*, 402-408.
- Loi, P., Matsukawa, K., Ptak, G., Clinton, M., Fulka, J., Jr., Nathan, Y., and Arav, A. (2008). Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. *PLoS One* *3*, e2978.
- Lyahyai, J., Mediano, D.R., Ranera, B., Sanz, A., Remacha, A.R., Bolea, R., Zaragoza, P., Rodellar, C., and Martin-Burriel, I. (2012). Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet Res* *8*, 169.
- Mansur, N.R., Meyer-Siegler, K., Wurzer, J.C., and Sirover, M.A. (1993). Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in normal human cells. *Nucleic Acids Res* *21*, 993-998.
- Marcinkiewicz, M.M., Baker, S.T., Wu, J., Hubert, T.L., and Wolfson, M.R. (2016). A Novel Approach for Ovine Primary Alveolar Epithelial Type II Cell Isolation and Culture from Fresh and Cryopreserved Tissue Obtained from Premature and Juvenile Animals. *PLoS One* *11*, e0152027.
- Marquez-Curtis, L.A., Janowska-Wieczorek, A., McGann, L.E., and Elliott, J.A. (2015). Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology* *71*, 181-197.
- Mascotti, K., McCullough, J., and Burger, S.R. (2000). HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion* *40*, 693-696.
- Massood, E., Maryam, K., Parvin, S., Mojgan, M., and Nouredin, N.M. (2013). Vitrification of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Cryo Letters* *34*, 471-480.
- Maxwell, W.M.C., and Watson, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science* *42*, 55-65.

- Mayor, S. (2004). First stem cell bank in the world is opened in UK. In *Bmj (England)*, p. 1277.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247, C125-142.
- Mazur, P., Leibo, S.P., and Chu, E.H. (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 71, 345-355.
- Mazur, P., and Rigopoulos, N. (1983). Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate. *Cryobiology* 20, 274-289.
- McCarty, R.C., Gronthos, S., Zannettino, A.C., Foster, B.K., and Xian, C.J. (2009). Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 219, 324-333.
- McGee, H.A., and Martin, W.J. (1962). Cryochemistry. *Cryogenics* 2, 257-267.
- McGinnis, L.K., Zhu, L., Lawitts, J.A., Bhowmick, S., Toner, M., and Biggers, J.D. (2005). Mouse sperm desiccated and stored in trehalose medium without freezing. *Biol Reprod* 73, 627-633.
- Mechiche Alami, S., Velard, F., Draux, F., Siu Paredes, F., Josse, J., Lemaire, F., Gangloff, S.C., Graesslin, O., Laurent-Maquin, D., and Kerdjoudj, H. (2014). Gene screening of Wharton's jelly derived stem cells. *Biomed Mater Eng* 24, 53-61.
- Mediano, D.R., Sanz-Rubio, D., Bolea, R., Marin, B., Vazquez, F.J., Remacha, A.R., Lopez-Perez, O., Fernandez-Borges, N., Castilla, J., Zaragoza, P., *et al.* (2015). Characterization of mesenchymal stem cells in sheep naturally infected with scrapie. *J Gen Virol* 96, 3715-3726.
- Mehrabani, D., and Manafi, N. (2013). Role of cultured skin fibroblasts in aesthetic and plastic surgery. *World J Plast Surg* 2, 2-5.
- Meyer-Siegler, K., Rahman-Mansur, N., Wurzer, J.C., and Sirover, M.A. (1992). Proliferative dependent regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in human cells. *Carcinogenesis* 13, 2127-2132.
- Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D.B., and Strom, S.C. (2005). Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 23, 1549-1559.
- Miki, T., Wong, W., Zhou, E., Gonzalez, A., Garcia, I., and Grubbs, B.H. (2016). Biological impact of xeno-free chemically defined cryopreservation medium on amniotic epithelial cells. *Stem Cell Res Ther* 7, 8.
- Monzo, C., Haouzi, D., Roman, K., Assou, S., Dechaud, H., and Hamamah, S. (2012). Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Hum Reprod* 27, 2160-2168.
- Morris, G.J., and Acton, E. (2013). Controlled ice nucleation in cryopreservation--a review. *Cryobiology* 66, 85-92.
- Naaldijk, Y., Friedrich-Stockigt, A., Sethe, S., and Stolzing, A. (2013). Comparison of different cooling rates for fibroblast and keratinocyte cryopreservation. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Naaldijk, Y., Staude, M., Fedorova, V., and Stolzing, A. (2012). Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnol* 12, 49.
- Nakajima, T., Enosawa, S., Mitani, T., Li, X.K., Suzuki, S., Amemiya, H., Koiwai, O., and Sakuragawa, N. (2001). Cytological examination of rat amniotic epithelial cells and cell transplantation to the liver. *Cell Transplant* 10, 423-427.
- Nakamura, A., Dohi, Y., Akahane, M., Ohgushi, H., Nakajima, H., Funaoka, H., and Takakura, Y. (2009). Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 15, 169-180.
- Ock, S.A., and Rho, G.J. (2011). Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs). *Cell Transplant* 20, 1231-1239.
- Olaciregui, M., and Gil, L. (2017). Freeze-dried spermatozoa: A future tool? *Reprod Domest Anim* 52 Suppl 2, 248-254.
- Page, R.L., Ambady, S., Holmes, W.F., Vilner, L., Kole, D., Kashpur, O., Huntress, V., Vojtic, I., Whitton, H., and Dominko, T. (2009). Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. *Cloning Stem Cells* 11, 417-426.
- Patrick, J., Comizzoli, P., and Elliott, G. (2017). Dry Preservation of Spermatozoa: Considerations for Different Species. *Biopreserv Biobank* 15, 158-168.
- Payen, E., Pailhoux, E., Gianquinto, L., Hayes, H., Le Pennec, N., Bezard, J., and Cotinot, C. (1997). The ovine SOX2 gene: sequence, chromosomal localization and gonadal expression. *Gene* 189, 143-147.

- Pegg, D.E. (1987). Mechanisms of freezing damage. *Symp Soc Exp Biol* 41, 363-378.
- Pegg, D.E. (1989). Viability assays for preserved cells, tissues, and organs. *Cryobiology* 26, 212-231.
- Pegg, D.E. (2002). The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med* 20, 5-13.
- Pennarossa, G., Maffei, S., Campagnol, M., Tarantini, L., Gandolfi, F., and Brevini, T.A. (2013). Brief demethylation step allows the conversion of adult human skin fibroblasts into insulin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 8948-8953.
- Phinney, D.G. (2012). Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *J Cell Biochem* 113, 2806-2812.
- Pierantozzi, E., Gava, B., Manini, I., Roviello, F., Marotta, G., Chiavarelli, M., and Sorrentino, V. (2011). Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev* 20, 915-923.
- Polge, C., Smith, A.U., and Parkes, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666.
- Rodrigues, J.P., Paraguassu-Braga, F.H., Carvalho, L., Abdelhay, E., Bouzas, L.F., and Porto, L.C. (2008). Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology* 56, 144-151.
- Ruffing, N.A., Steponkus, P.L., Pitt, R.E., and Parks, J.E. (1993). Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology* 30, 562-580.
- Saraste, A., and Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45, 528-537.
- Seo, M.S., Park, S.B., and Kang, K.S. (2012). Isolation and characterization of canine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 21, 1493-1502.
- Shi, L.Y., Jin, H.F., Kim, J.G., Mohana Kumar, B., Balasubramanian, S., Choe, S.Y., and Rho, G.J. (2007). Ultrastructural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. *Anim Reprod Sci* 100, 128-140.
- Sieme, H., Oldenhof, H., and Wolkers, W.F. (2015). Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 50 Suppl 3, 20-26.
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T.W., Guo, G., van Oosten, A.L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., and Smith, A. (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138, 722-737.
- Somal, A., Bhat, I.A., B, I., Singh, A.P., Panda, B.S.K., Desingu, P.A., Pandey, S., Bharti, M.K., Pal, A., Saikumar, G., *et al.* (2017). Impact of Cryopreservation on Caprine Fetal Adnexa Derived Stem Cells and Its Evaluation for Growth Kinetics, Phenotypic Characterization, and Wound Healing Potential in Xenogenic Rat Model. *J Cell Physiol* 232, 2186-2200.
- Sonna, L.A., Fujita, J., Gaffin, S.L., and Lilly, C.M. (2002). Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol* (1985) 92, 1725-1742.
- Spindler, R., Rosenhahn, B., Hofmann, N., and Glasmacher, B. (2012). Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation. *Cryobiology* 64, 250-260.
- Stokes, D.J. (2003). Recent advances in electron imaging, image interpretation and applications: environmental scanning electron microscopy. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 361, 2771-2787.
- Stott, S.L., and Karlsson, J.O. (2009). Visualization of intracellular ice formation using high-speed video cryomicroscopy. *Cryobiology* 58, 84-95.
- Succu, S., Bebbere, D., Bogliolo, L., Ariu, F., Fois, S., Leoni, G.G., Berlinguer, F., Naitana, S., and Ledda, S. (2008). Vitrification of in vitro matured ovine oocytes affects in vitro pre-implantation development and mRNA abundance. *Mol Reprod Dev* 75, 538-546.
- Succu, S., Leoni, G.G., Bebbere, D., Berlinguer, F., Mossa, F., Bogliolo, L., Madeddu, M., Ledda, S., and Naitana, S. (2007). Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 74, 1337-1344.
- Sztejn, J.M., Noble, K., Farley, J.S., and Mobraaten, L.E. (2001). Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 42, 28-39.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.

- Tathagata, A., and V., D.R. (2010). Cryomicroscopic investigations of freezing processes in cell suspensions. *The Open Biotechnology Journal* 4, 26 - 35.
- Toner, M., Cravalho, E.G., and Karel, M. (1993). Cellular response of mouse oocytes to freezing stress: prediction of intracellular ice formation. *J Biomech Eng* 115, 169-174.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., and Spiegelman, B.M. (1994). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8, 1224-1234.
- Turathum, B., Saikhun, K., Sangsuwan, P., and Kitiyanant, Y. (2010). Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. *Reprod Biol Endocrinol* 8, 70.
- Vacanti, V., Kong, E., Suzuki, G., Sato, K., Canty, J.M., and Lee, T. (2005). Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol* 205, 194-201.
- Wakayama, T., and Yanagimachi, R. (1998). Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* 16, 639-641.
- Wang, H.Y., Lun, Z.R., and Lu, S.S. (2011). Cryopreservation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells without dimethyl sulfoxide. *Cryo Letters* 32, 81-88.
- Wang, L., Li, Z.Y., Wang, Y.P., Wu, Z.H., and Yu, B. (2015). Dynamic Expression Profiles of Marker Genes in Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *Chin Med Sci J* 30, 108-113.
- Wang, X., Hua, T.C., Sun, D.W., Liu, B., Yang, G., and Cao, Y. (2007). Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me2SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. *Cryobiology* 55, 60-65.
- Wang, X., Zhao, Y., Xiao, Z., Chen, B., Wei, Z., Wang, B., Zhang, J., Han, J., Gao, Y., Li, L., *et al.* (2009). Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response. *Stem Cells* 27, 1265-1275.
- Watt, S.M., Austin, E., and Armitage, S. (2007). Cryopreservation of hematopoietic stem/progenitor cells for therapeutic use. *Methods Mol Biol* 368, 237-259.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Wowk, B. (2015). 30. Roles of ice-active agents in organ cryopreservation. *Cryobiology* 71, 172-173.
- Wu, G., and Scholer, H.R. (2014). Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regen (Lond)* 3, 7.
- Xu, Y., Zhao, G., Zhou, X., Ding, W., Shu, Z., and Gao, D. (2014). Biotransport and intracellular ice formation phenomena in freezing human embryonic kidney cells (HEK293T). *Cryobiology* 68, 294-302.
- Yang, J., Diaz, N., Adelsberger, J., Zhou, X., Stevens, R., Rupert, A., Metcalf, J.A., Baseler, M., Barbon, C., Imamichi, T., *et al.* (2016). The effects of storage temperature on PBMC gene expression. *BMC Immunol* 17, 6.
- Yi, J., Liang, X.M., Zhao, G., and He, X. (2014). An improved model for nucleation-limited ice formation in living cells during freezing. *PLoS One* 9, e98132.
- Yiu, W.K., Basco, M.T., Aruny, J.E., Cheng, S.W., and Sumpio, B.E. (2007). Cryosurgery: A review. *Int J Angiol* 16, 1-6.
- Yong, K.W., Pinguan-Murphy, B., Xu, F., Abas, W.A., Choi, J.R., Omar, S.Z., Azmi, M.A., Chua, K.H., and Wan Safwani, W.K. (2015). Phenotypic and functional characterization of long-term cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Sci Rep* 5, 9596.
- Yu, G., Yap, Y.R., Pollock, K., and Hubel, A. (2017). Characterizing Intracellular Ice Formation of Lymphoblasts Using Low-Temperature Raman Spectroscopy. *Biophys J* 112, 2653-2663.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Yu, Y.Y., and Zhu, Z.G. (2010). Significance of biological resource collection and tumor tissue bank creation. *World J Gastrointest Oncol* 2, 5-8.
- Zhang, X., Catalano, P.N., Gurkan, U.A., Khimji, I., and Demirci, U. (2011). Emerging technologies in medical applications of minimum volume vitrification. *Nanomedicine (Lond)* 6, 1115-1129.

7 APPENDICE

Liquid Marble: un lavoro collaterale

Le attività di ricerca che hanno costituito il corpo della tesi di dottorato sono state affiancate a margine da alcune sperimentazioni collaterali.

Tra queste, lo studio di microbioreattori definiti “liquid marble” rappresenta un campo di indagine innovativo e versatile.

Tali costrutti sono costituiti da un guscio esterno di particelle colloidali idrofobiche contenente all’interno una goccia di liquido. Essi rappresentano un valido metodo colturale, alternativo alle tradizionali tecniche di coltura in vitro. Le proprietà porose e non adesive dell’involucro particolato permettono il libero scambio gassoso attraverso il guscio e l’isolamento del contenuto liquido dalle superfici esterne. In presenza di un ridotto volume di soluzione, la conformazione del costrutto appare sferica, compatta e stabile in conseguenza della bassa energia superficiale.

Il microambiente riprodotto nel liquid marble crea un contesto colturale che favorisce la comunicazione paracrina tra le cellule e supera i limiti spaziali imposti dalle tradizionali colture bidimensionali, promuovendo l’aggregazione cellulare e la costruzione della fisiologica architettura tridimensionale dell’organismo.

Lo studio realizzato, di cui si riporta la relativa pubblicazione scientifica, si inserisce nel contesto delle indagini sulla biologia della riproduzione che caratterizzano il laboratorio presso il quale è stata condotta l’intera attività sperimentale ed apporta un interessante elemento di novità rispetto alle tradizionali metodiche di maturazione dell’ocita.

Tuttavia, le applicazioni della tecnica dei bioreattori di liquid marble si estendono oltre il settore riproduttivo e toccano diversi ambiti biomedici. Infatti, questa piattaforma apre promettenti campi di sviluppo nel contesto degli studi sulle cellule staminali. La formazione di sferoidi, favorita dalla corretta aggregazione spaziale, costituisce una componente decisiva nel promuovere il naturale fenotipo morfo-funzionale delle staminali e permette di esplorarne le relative capacità differenziative. Questa linea di ricerca è al momento in fase di sviluppo.



A novel technique for in vitro maturation of sheep oocytes in a liquid marble microbioreactor

S. Ledda¹ · A. Idda¹ · J. Kelly² · F. Ariu¹ · L. Bogliolo¹ · D. Bebbere¹

Received: 19 November 2015 / Accepted: 20 January 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract

Purpose The aim of this work was to develop a microbioreactor using liquid marble (LM) as a novel system for oocyte in vitro maturation (IVM) in small volumes.

Methods Cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained from slaughterhouse sheep ovaries were in vitro matured in a LM system prepared by placing a drop (30 µl containing 10 COCs) suspended in TCM 199 supplemented with 10 % (v/v) oestrus sheep serum (OSS) and 0.1 IU FSH and LH onto a polytetrafluoroethylene (PTFE) particle bed (LM group). As a control group (CTRL group), COCs were in vitro matured in standard volume and conditions (600 µl of IVM medium in a four-well dish). After 24-h culture at 38.5 °C in 5 % CO₂ in air, COCs were released from LM and the following parameters were evaluated: (a) percentage of MII oocytes, (b) oocyte developmental competence following in vitro fertilization (IVF) or parthenogenetic activation (PA) and embryo culture for 8 days in synthetic oviductal fluid (SOF) medium at 38.5 °C in 5 % O₂, 5 % CO₂, and 90 % N₂.

Results The results indicated similar percentage of MII oocytes in LM and CTRL groups (88.0 vs. 92.0 %). No differences were observed in blastocyst rate after IVF (LM 47.5 % vs. CTRL 50.2 %, P=0.637) or PA (LM 44.4 % vs. CTRL 48.3 %, P=0.426).

Conclusions The results indicate that LM microbioreactor is a viable technique that provides a suitable microenvironment to induce oocyte in vitro maturation.

Keywords Liquid marble · Bioreactor · Oocyte · In vitro maturation · Embryo development

Introduction

In vitro oocyte maturation is a well-established technique largely applied to in vitro embryo production in the livestock field [1]. However, in most mammalian species, even if high rates of in vitro meiotic maturation of cumulus-oocyte complexes (COCs) are obtained (range 60 to 90 %) [2], the developmental competence of the in vitro matured oocyte is still suboptimal as indicated by the relative low development up to blastocyst stage and the poor viability to term after transfer into recipient animals.

Several attempts have been made to increase the developmental competence of embryos derived from in vitro matured oocytes; these include the formulation of specific maturation media [3], length of in vitro culture [4, 5], addition of growth factors and molecules during in vitro culture [6, 7], and the support action exerted by the addition of different somatic cells in the co-culture systems [8].

Liquid marbles (LM) are a form of 3D bioreactor that have been previously shown to support the growth of living microorganisms [9], tumor spheroids [10], fibroblasts [11], red blood cells [12], and embryonic stem cells [13]. LM, first described by Aussillous and Quere [14], consists of a drop of liquid

Capsule The results indicate that liquid marble microbioreactors provide a microenvironment capable of supporting mammalian oocyte in vitro maturation conducive to blastocyst development.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10815-016-0666-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ S. Ledda
giodi@uniss.it

¹ Department of Veterinary Medicine, University of Sassari via Vienna 2, 07100 Sassari, Italy

² Turretfield Research Centre, South Australian Research and Development Institute, Rosedale, South Australia 5350, Australia

Published online: 06 February 2016

Springer

encapsulated by hydrophobic powder particles. The particles adhere to the surface of the liquid drop, isolating the liquid core from the supporting surface, while allowing gas exchange between the interior liquid and the surrounding environment. The coating material acts as a confined space which is non-adhesive and allows the cells to freely interact with each other.

This new technical procedure could provide a novel 3D in vitro culture system that (1) allows oocyte in vitro maturation in a reduced medium volume, (2) maintains the gaseous in vitro culture environment, and (3) avoids the exchange with other solid and liquid surfaces that could interfere with the physiological processes.

The aim of this work was to develop a microbioreactor using LM for the in vitro maturation of sheep oocytes. The feasibility of the system was tested by evaluation of oocyte in vitro meiotic competence and embryo development up to blastocyst stage following in vitro fertilization or parthenogenetic activation.

Materials and methods

All chemicals in this study were purchased from Sigma-Aldrich S.r.l. (Milan, Italy) unless stated otherwise.

Source of oocytes and in vitro maturation

Ovaries of adult Sarda sheep (4–6 years old) were collected from a local slaughterhouse in PBS solution (Dulbecco's phosphate-buffered saline) containing penicillin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) and streptomycin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) at 37°C . Cumulus-oocytes complexes (COCs) were recovered by slashing in sterile Petri dishes containing dissection medium (20 mM Hepes-buffered TCM 199 supplemented with 0.1 % (*w/v*) polyvinyl alcohol (PVA) and antibiotics. COCs with a uniform cytoplasm and several layers of unexpanded cumulus cells [15] were selected and randomly divided between two different in vitro maturation systems as outlined below.

A-control group (CTRL) Groups of 30–35 COCs were matured in 600 μl of TCM 199 supplemented with 10 % (*v/v*) oestrus sheep serum (OSS), 0.1 IU ml^{-1} FSH and 0.1 IU ml^{-1} LH (Pergonal, Serono Italy), 8 mg/ml of pyruvate and 100 mM cysteamine (in vitro maturation (IVM) medium). COCs were cultured in four-well Petri dishes (Nunc; Nalge Nunc

International, Roskilde, Denmark) covered with 300 μl pre-equilibrated mineral oil for 24 h under 5 % CO_2 in air at 38.5°C .

B-liquid marble group (LM) LM microbioreactor was created inside a Petri dish by preparing a polytetrafluoroethylene (PTFE) powder bed with particle size of 1 μm ; a spatula was used to gently make a curved gully at the centre of the powder bed (Fig. 1a). A micropipette was used to dispense the required volume (30 μl) of IVM medium, containing a predetermined number of COCs (10 COCs for each drop) on the PTFE powder bed (Fig. 1b). The Petri dish was then gently shaken in a circular motion to ensure that the powder particles completely covered the surface of the liquid drop. LM drops were incubated in 35-mm Petri dishes for 24 h at 38.5°C in 5 % CO_2 in air (All procedures are shown in the supplement video). To increase humidity and avoid dehydration, the Petri dish was placed in a larger Petri dish containing sterile water and both Petri dishes were capped (Fig. 1c). All experiments were performed in three replicates.

In vitro fertilization and parthenogenetic activation

After 24 h, in vitro matured oocytes from the CTRL and LM systems were divided into two groups (within treatment) and either in vitro fertilized (IVF) or parthenogenetically activated (PA). COCs from the LM drops were released by the addition of IVM culture volume (200 μl) over the LM drops. In vitro fertilization (IVF) was performed as previously described by Bebbere et al. [15], in synthetic oviductal fluid (SOF, [16]) + 2 % OSS + 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ heparin + 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ hypotaurine for 22 h at 38.5°C and under a 5 % CO_2 , 5 % O_2 , and 90 % N_2 atmosphere in four-well Petri dishes with frozen/thawed spermatozoa selected by swim-up technique (1×10^6 spermatozoa/ ml^{-1}). Parthenogenetic activation (PA) was performed by incubation of COCs with 5 μM ionomycin for 5 min, followed by 3-h culture in 2 mM of 6-dimethyl amino purine (6-DMAP) [17] (Fig. 2).

In vitro embryo development

IVF and PA presumptive zygotes were cultured (within treatment) for 8 days in SOF + essential and non-essential amino acids at oviductal concentration [18] + 0.4 % bovine serum albumin (BSA) under mineral oil, in four-well Petri dishes in

Table 1 In vitro maturation and developmental competence of sheep oocytes cultured in liquid marble (LM) microbioreactor and control (CTRL) systems

Culture system	No. of oocytes	No. of M II oocytes (%)	No. of cleaved embryos (40–48 h post IVF)		No. of blastocyst (8 days post IVF/PA)	
			IVF (%)	PA (%)	IVF (%)	PA (%)
CTRL	200	184 (92.0)	76/102 (74.5)	61/82 (74.4)	45/76 (59.2)	29/61 (47.5)
LM	141	124 (88.0)	60/84 (71.4)	27/40 (67.5)	32/60 (53.3)	12/27 (44.4)

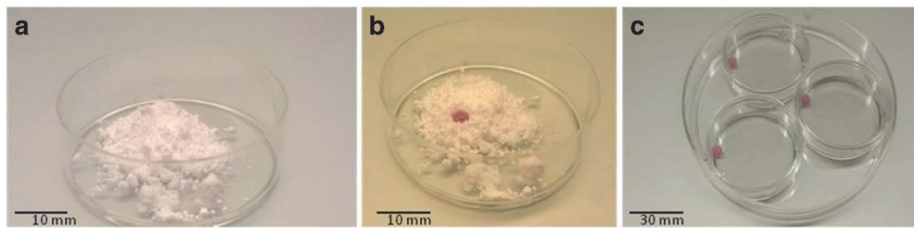


Fig. 1 Preparation of liquid marble containing COCs. **a** A hydrophobic PTFE powder bed is prepared in a 35-mm Petri dish. **b** 30 µl of IVM medium, containing 10 COCs, is dispensed over the hydrophobic PTFE powder bed. To fully coat the IVM drop by the PTFE powder, the IVM

drop is gently rolled over the PTFE powder. **c** The resulting LM drop is placed in a 35-mm Petri dish placed within a bigger Petri dish containing sterile water to prevent evaporation

maximum humidified atmosphere with 5 % CO₂, 5 % O₂, and 90 % N₂ at 38.5 ° C. Cleavage rates were recorded 40–48 h after the start of fertilization or parthenogenetic activation. Blastocyst development was recorded on day 8 (day 0=day of IVF or PA).

Statistical analysis

In vitro maturation and embryonic development rates were analyzed by chi-square test at each time point. The differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

After 24 of IVM culture, COCs derived from both the LM and CTRL groups showed similar expansion of cumulus cells (personal communication). The percentage of COCs that reached MII did not differ between LM and CTRL groups (88.0 vs. 92.0 %, $P = 0.212$, respectively), and no statistical differences were observed in the blastocyst rate after IVF (LM 47.5 % vs. CTRL 50.2 %, $P = 0.637$) or PA (LM 44.4 % vs. CTRL 48.3 %, $P = 0.426$), Table 1.

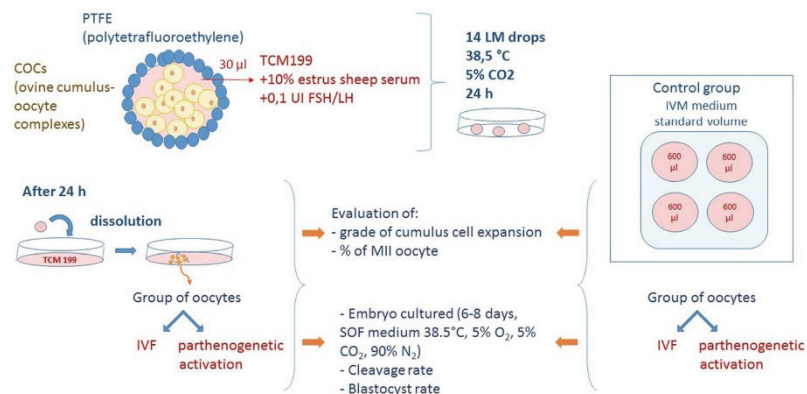
Discussion

In this work, we present, for the first time, a reliable method for a microbioreactor of liquid marble (LM) for in vitro maturation of sheep oocytes. Our data demonstrate that the LM system does not affect oocyte in vitro maturation and developmental competence after IVF or PA. Reports indicate a number of different systems have been employed to in vitro mature oocytes and culture embryos in small volumes of media. The mini drops covered by oil (ranging between 6 and 50 µl, [19]), the hanging drops system [20], the micromultiwell (MW) plates [21], and the Well of the Well (WOW) system [22] are the most experimented systems used for the COCs and embryo culture in a small volume. These systems offer some advantages, but also have limitations.

The two main reasons to culture COCs and embryos in small medium volumes are (1) to benefit from the autocrine and paracrine secretion that may be produced by the somatic cells, the oocyte, or other supporting cells and (2) to monitor individual COCs or embryo development, thereby providing a new perspective on nutrient uptake and utilization.

However, culturing COCs or embryos in a small volume of medium can present technical problems. Uncovered culture medium droplets are impractical because of (1) the rapid rise

Fig. 2 Schematic steps leading to in vitro maturation in liquid marble (LM) microbioreactor and control (CTRL) group and subsequent in vitro fertilization or parthenogenetic activation and embryo culture



in salt and substrate concentration resulting from evaporation and (2) the increased sensitivity to temperature changes. The commonly used oil overlay may minimize these problems, but the high surface/volume ratio of oil to medium may result in high diffusion of lipid solvable materials necessary for oocyte and or embryo development [23]. In this regard, it has been reported that progesterone and estrogens diffuse into the mineral oil during oocyte culture [24]. A delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes has also been found after mineral oil overlay of in vitro maturation media [25].

To avoid the use of oil overlay, an alternative system for in vitro maturation of COCs in a small volume is the hanging drop culture system. The hanging drop monoculture has been used for screening substances that affect oocyte culture, for example testing the addition of antioxidants during in vitro culture of porcine oocytes [20], or to measure the consumption of energy substrates in vitro culture of mouse and canine oocytes [26, 27]. The main limitations of the hanging drop system are the following: (1) it is not suitable for microscopic tracking and (2) it is not practical for media exchange or for the addition of specific molecules. Moreover, in both systems (mini drops cover by oil and hanging drops), the droplet volume should not be less than 10 μ l. In less than 10 μ l medium droplets, development is lower than that observed in droplets with a larger volume size [21]. This decrease in development may be attributed to the accumulation of toxic substances in the fluid volume surrounding the COCs.

Micromultiwell plates (MW) have also been used for in vitro oocyte maturation or embryo culture without oil overlay, but the few studies performed with commercial available tools have not significantly improved the developmental rates. The results of IVM system of individual bovine oocytes using the MW showed that the acquisition of developmental competence was higher compared with oocyte matured in small drops cover by mineral oil but the same when compared with the conventional group IVM culture [21].

“The Well-of-the-Well (WOW) culture system” cultures embryos in microwells formed on the bottom of a four-well culture dish [22]. Compared with culturing in drops, the WOW system resulted in significant improvements in developmental competence for in vitro matured and parthenogenetically activated porcine oocytes and for in vivo derived mouse zygotes [28]. In human studies, using a sibling oocyte design, embryos cultured in WOW developed to blastocyst stage in a significantly higher proportion than embryos cultured in a conventional system [28]. However, although the WOW system appears superior to the drop overlay by oil and to the hanging drop systems, it does not allow for the precise measurement of cellular needs or the addition of specific molecules. This is because the content of the well is openly connected with the large amount of medium above. On the other hand, the contact of the COC or embryo with a larger volume

of medium could overcome the accumulation of excessive toxic substances.

In this study, we are proposing an alternative system for in vitro culture of COCs in small volume. The LM microbioreactor system offers several advantages:

- Liquid marble is a realistic scaffold-free 3D bioreactor providing a maximum potential contact for aggregation of cells and could better simulate the follicular environment during meiotic maturation. The material coating LM is non-adhesive and acts as a confined space that allows suspended cells to freely interact with each other and self-assemble. Studies based on the use of liquid marbles for the multicellular growth have shown their ability to keep cells in suspension avoiding the problem of cell adhesion to the base of a cell culture dish. Increase in the efficiency of cell culture has been reported culturing tumor cells, fibroblasts, and embryonic stem cells in LM microbioreactor [10–13].
- The culture of LM offers the possibility to easily perform uptake of medium to be analyzed with the scope of evaluating COC requirements and performing medium changes in programmed time. It is evident that the identification of metabolites during assisted reproductive technology (ART) procedures could have relevant clinical implications. In fact, the discovery and measurement of biomarkers in ART could define gametes’ quality and embryo viability, thus helping embryologists to achieve selection criteria alternative, or complementary, to the standard morphological assessments. Moreover, metabolomic profiling of culture media could be used to evaluate the health of the oocyte during in vitro maturation (IVM) and could facilitate selection of oocytes to be frozen in cryopreservation programs [29]. The LM system for IVM excludes the need to overlay small media volumes with mineral oil and hence could be a good system to perform precise measurements of different metabolic fingerprints in the spent medium and may also provide predictive information on subsequent embryo development. However, larger prospective studies are indeed required to further validate these methodologies in order to fully optimize their value as predictors of gamete and/or embryo quality.
- The size of LM droplets is variable and can be adjusted according to the number of COCs. This maintains the advantage of culturing COCs in groups but can facilitate the incubation of single COC by reducing the drops size. However, as development is compromised in droplets with less than 10 μ l medium [21, 30], we recommend 30 μ l for in vitro oocyte maturation in LM microbioreactors. This size could be sufficient to dilute the possible accumulation of toxic substances such as ammonia [31, 32] or oxygen-derived free radicals [33], which may be harmful for oocyte maturation and lead to reduced developmental rates.

- The easy access to the LM microbioreactor facilitates the addition of novel candidate drugs. By using small volumes, the protocol is “cost saving” because it limits the amount of reagents, such as growth factors or test compounds, needed for the assays. The dimensions of LM microbioreactors are modular according to the needs of cells and thus are also likely to culture separately cumulus cells and oocyte to monitor, in a fine-tuning manner, levels of nutrient and/or drugs.
- In addition, the LM microbioreactor system could be adapted for use in culturing embryos in groups or individually, thereby offering the same potential benefits to evaluate embryos as outlined for COCs above. The small dimensions of LM are also suitable for the development of other ART techniques when a reduced volume is required as in vitro follicular growth and oocyte/embryo vitrification.

Conclusions

This technique could be used in a variety of applications including evaluating individual COC requirements. The potential application areas of LM microbioreactor system are not restricted to in vitro maturation. The system can offer advantages also for certain forms of oocyte fertilization and individual embryo culture. In addition, it reduces reagent consumption and decreases the potential for contamination, as a result of the indirect contact between the liquid core and the supporting surface.

Further application fields in the areas of reproductive biology are also conceivable.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

References

1. Paramio MT, Izquierdo D. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reprod Domest Anim.* 2014;49(4):37–48.
2. Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology.* 2007;67:6–15.
3. Farsi MM, Kamali N, Pourghasem M. Embryological aspects of oocyte in vitro maturation. *Int J Mol Cell Med.* 2013;2(3):99–109.
4. You J, Lee E, Bonilla L, Francis J, Koh J, Block J, et al. Treatment with the proteasome inhibitor MG132 during the end of oocyte maturation improves oocyte competence for development after fertilization in cattle. *PLoS One.* 2012;7(11):e48613. doi:10.1371/journal.pone.0048613. Published online 2012 November 7.
5. Donnay I, Faerge I, Grøndahl C, Verhaeghe B, Sayoud H, Ponderato N, et al. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. *Theriogenology.* 2004;62(6):1093–107.
6. Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Calvia P, Naitana S. Influence of vasoactive intestinal peptide (VIP), atrial natriuretic peptide (ANP) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on in vitro maturation of prepubertal and adult sheep oocytes. *Zygote.* 1996;4:343–8.
7. Uhm SJ, Gupta MK, Yang JH, et al. Epidermal growth factor can be used in lieu of follicle-stimulating hormone for nuclear maturation of porcine oocytes in vitro. *Theriogenology.* 2010;73:1024–36.
8. Lin YH, Hwang JL, Seow KM, Huang LW, Chen HJ, Tzeng CR. Effects of growth factors and granulosa cell co-culture on in-vitro maturation of oocytes. *Reprod BioMed Online.* 2009;19(2):165–70.
9. Tian J, Fu N, Chen XD, Shen W. Respirable liquid marble for the cultivation of microorganisms. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2013;106:187–90.
10. Arbatan T, Al-Abboodi A, Sarvi F, Chan PP, Shen W. Tumor inside a pearl drop. *Adv Healthc Mater.* 2012. doi:10.1002/adhm.201200050.
11. Serrano MC, Nardecchia S, Gutierrez MC, Ferrer ML, del Monte F. Mammalian cell cryopreservation by using liquid marbles. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7:3854–60.
12. Arbatan T, Li L, Tian J, Shen W. Liquid marbles as microbioreactors for rapid blood typing. *Adv Healthc Mater.* 2012;1:80–3.
13. Sarvi F, Jain K, Arbatan T, Verma PJ, Hourigan K, Thompson MC, et al. Cardiogenesis of embryonic stem cells with liquid marble micro-bioreactor. *Adv Healthc Mater.* 2015;4:77–86.
14. Aussillous P, Quéré D. Liquid marbles. *Nature.* 2001;411:924–7.
15. Bebbere D, Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Leoni GG, Tore S, et al. Expression pattern of zygote arrest 1 (ZAR1), maternal antigen that embryo requires (MATER), growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) genes in ovine oocytes and in vitro-produced Preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev.* 2008;20(8):908–15.
16. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil.* 1972;30(3):493–7.
17. Loi P, Ledda S, Fulka Jr J, Cappai P, Moor RM. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol Reprod.* 1998;58(5):1177–87.
18. Walker SK, Hill JL, Kleemann DO, Nancarrow CD. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod.* 1996;55(3):703–8.
19. Dai SJ, Xu CL, Wang J, Sun YP, Chian RC. Effect of culture medium volume and embryo density on early mouse embryonic development: tracking the development of the individual embryo. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(7):617–23.
20. Ishikawa S, Machida R, Hiraga K, Hiradate Y, Suda Y, Tanemura K. Hanging drop monoculture for selection of optimal antioxidants during in vitro maturation of porcine oocytes. *Reprod Domest Anim.* 2014;49(2):26–30.
21. Nagano M, Kang SS, Koyama K, Huang W, Yanagawa Y, Takahashi Y. In vitro maturation system for individual culture of bovine oocytes using micro-volume multi-well plate. *Jpn J Vet Res.* 2013;61(4):149–54.
22. Vajta G, Peura TT, Holm P, Paldi A, Greve T, Trounson AO, et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. *Mol Reprod Dev.* 2000;55:256–64.
23. Otsuki J, Nagai Y, Chiba K. Damage of embryo development caused by peroxidized mineral oil and its association with albumin in culture. *Fertil Steril.* 2009;91:1745–9.

24. Reinsberg J, Ackermann D, Van der Ven H. Pitfalls in assessment of progesterone production by granulosa cells cultured in contact with silicone rubber or paraffin oil. *Arch Gynecol Obstet.* 2004;270:174–8.
25. Shimada M, Kawano N, Terada T. Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of in vitro maturation media. *Reproduction.* 2002;124:557–64.
26. Downs SM, Utecht AM. Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes. *Biol Reprod.* 1999;60(6):1446–52.
27. Songsasen N, Spindler RE, Wildt DE. Requirement for, and patterns of, pyruvate and glutamine metabolism in the domestic dog oocyte in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2007;74(7):870–7.
28. Vajta G, Korösi T, Du Y, Nakata K, Ieda S, Kuwayama M, et al. The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reprod BioMed Online.* 2008;17(1):73–81.
29. Nagy ZP, Jones-Colon S, Roos P, Botros L, Greco E, Dasig J, et al. Metabolomic assessment of oocyte viability. *Reprod BioMed Online.* 2009;18(2):219–25.
30. Lane M, Gardenr DK. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. *Hum Reprod.* 1992;7:558–62.
31. Gardner DK, Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod.* 1993;48:377–85.
32. Sinclair KD, McEvoy TG, Carolan C, Maxfield EK, Maltin CA, Young LE, et al. Conceptus growth and development following in vitro culture of ovine embryos in media supplemented with bovine sera. *Theriogenology.* 1998;49:218.
33. Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reprod BioMed Online.* 2009;18(6):864–80.

Ringraziamenti

Grazie al Professor Sergio Ledda per avermi accolta in questo percorso di dottorato; ha fatto emergere la mia tenacia e, mettendomi alla prova e credendo nelle mie capacità, ha arricchito la mia esperienza professionale ed umana.

Ringrazio tutti i collaboratori che a vario titolo hanno contribuito alla realizzazione degli esperimenti contenuti in questa tesi. In particolare la Dottoressa Bebbere per la pazienza e la disponibilità nel trasmettermi gli insegnamenti di biologia molecolare; il Professor Cincotti e la Dottoressa Casula per il proficuo scambio nella realizzazione delle analisi biofisiche dei fibroblasti; il Dott. Arav per la realizzazione degli studi sulla liofilizzazione.

Un sentito grazie alla Dottoressa Lange Consiglio e al Professor Cremonesi per avermi ospitato con squisita professionalità e umanità nel loro laboratorio di Lodi, permettendomi di portare avanti le sperimentazioni sulle cellule cordonali e di arricchire la mia esperienza nel settore della ricerca.

Grazie di cuore alle colleghe Dott.sse Falchi, Masala, Murrone, Vlachopoulou e alle amiche Laura, Lilli, Ombretta e Gina per l'aiuto, i consigli, le revisioni e per tutto ciò che va oltre le mura del laboratorio.

Infine, grazie a tutti i colleghi, studenti, visiting Professor/student e Professori del Dipartimento di Medicina Veterinaria che nel corso dei tre anni trascorsi hanno fatto parte di quest'avventura.