



UNIVERSITÀ' DEGLI STUDI DI TRIESTE

**XXVII CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE DELLA RIPRODUZIONE
Indirizzo MEDICINA MATERNO INFANTILE
PERINATOLOGIA**

**Conservazione e possibilità di utilizzo di tessuto ovarico
e gameti per fini riproduttivi**

(Settore scientifico-disciplinare: MED/40 GINECOLOGIA E OSTETRICIA)

**DOTTORANDA
IRENE VENTURIN**

**COORDINATORE
PROF.SSA GIULIANA DECORTI**

**SUPERVISORI DI TESI
PROF. GIUSEPPE RICCI
PROF.SSA MARINA ZWEYER**

**CO-SUPERVISORE DI TESI
DOTT.SSA LORELLA PASCOLO**

Giuliana Decorti

Giuseppe Ricci

Marina Zweyer

Lorella Pascolo

ANNO ACCADEMICO 2014 / 2015

Sommario

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Preservazione della fertilità	4
1.2 La criopreservazione dei gameti	7
1.2.1 Tecnica del congelamento lento	9
1.2.2 Tecnica di vitrificazione	10
1.3 Criopreservazione di ovociti ed embrioni	11
1.4 Criopreservazione di tessuto ovarico.....	12
1.4.1 Metodi di congelamento del tessuto ovarico	14
1.4.2 Valutazione dell'efficienza della criopreservazione del tessuto ovarico	16
1.4.3 Nuove microscopie avanzate per la valutazione del tessuto ovarico	17
1.5 Criopreservazione del liquido seminale.....	22
1.5.1 Danni da crioconservazione nel liquido seminale e metodi di valutazione ...	24
1.5.2 Nuovi approcci per valutazione del danno al DNA.....	27
2. SCOPO DELLA TESI	31
3. MATERIALI E METODI	32
3.1 Reclutamento delle pazienti e raccolta campioni di tessuto ovarico.....	32
3.2 Trattamento della biopsia.....	32
3.3 Protocolli di crioconservazione	33
3.3.1 Congelamento Lento e scongelamento	33
3.3.2 Vitrificazione e scongelamento	34
3.4 Valutazione dell'integrità del tessuto ovarico dopo criopreservazione	34
3.4.1 Microscopia ottica	34
3.4.2 Microscopia elettronica a trasmissione	36
3.4.3 Analisi statistica	37
3.4.4 Microspettroscopia in fluorescenza da raggi X (XRF).....	37
3.5 Reclutamento dei pazienti e raccolta campioni di liquido seminale	39

3.5.1 Preparazione del campione per analisi FTIR	39
3.5.2 Induzione dello stress ossidativo.....	39
3.5.3 Spettroscopia FTIR e analisi dei dati.....	40
3.5.4 Microscopia a raggi X e μ XRF e analisi dei dati	40
3.5.5 Procedura di congelamento/scongelamento del liquido seminale	41
3.5.6 Colorazione con arancio di acridina e valutazione	42
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	44
4.1 Comparazione dei protocolli per la criopreservazione del tessuto ovarico: congelamento lento e vitrificazione	44
4.1.1 Microscopia ottica	46
4.1.2 Microscopia elettronica a trasmissione	50
4.1.3 Analisi XRF per comprendere i cambiamenti biochimici nei tessuti ovarici danneggiati.....	56
4.1.4 Confronto tra microscopia avanzata e microscopie tradizionali	61
4.2 Nuovi approcci per la valutazione del danno da congelamento negli spermatozoi	63
4.2.1 Studio di fattibilità dell'uso della spettroscopia vibrazionale FTIR per valutare il danno ossidativo negli spermatozoi	63
4.2.2 Valutazione del danno al DNA con un metodo tradizionale: stress ossidativo vs congelamento	71
5.CONCLUSIONI	74
6. BIBLIOGRAFIA.....	80

1. INTRODUZIONE

1.1 Preservazione della fertilità

La preservazione della fertilità è un tema della ricerca e della clinica che negli ultimi anni sta emergendo, in quando è sempre più elevato il numero di uomini e donne in età fertile, ma soprattutto bambini, che rischiano di divenire sterili per molteplici ragioni [1].

Una delle patologie più rilevanti in questo contesto è il cancro. La Società Americana per il Cancro (ACS) ha stabilito che solo negli USA nel 2015 ci sono state 1.658.370 nuove diagnosi [2]. È importante però ricordare che grazie alla diagnosi precoce di alcuni tumori e al netto miglioramento delle terapie antitumorali, il tasso di sopravvivenza a cinque anni negli ultimi decenni è aumentato a circa il 68% [2].

Questo comporta che persone in età fertile che hanno avuto il cancro possono sperare, nel loro futuro, di concepire e diventare genitori. Tuttavia i trattamenti di chemioterapia e radioterapia sono gonadotossici e possono causare infertilità [3]. Ecco che la preservazione dei gameti prelevati prima dei trattamenti chemioterapici diventa, a volte, l'unica possibilità di procreare, oltretutto senza condizionare la salute del nascituro.

Ci sono poi altri gruppi di pazienti che possono trarre vantaggio dai trattamenti per preservare la fertilità, perché svariate patologie, anche benigne, possono causare sterilità o infertilità (Tabella 1)

Pazienti con malattie autoimmuni come: lupus eritematoso sistemico, sclerosi sistemica, vasculite e artrite reumatoide molto spesso vengono trattati con farmaci immunosoppressivi gonadotossici, come la ciclofosfamide (CYC). Questo farmaco aiuta a prolungare la vita di questi pazienti, ma è associato a elevata tossicità in vari organi; nelle donne a livello dell'ovaio causando amenorrea e infertilità come conseguenza del fallimento ovarico prematuro (POF), e negli uomini a livello del testicolo causando atrofia testicolare, oligo o azoospermia [4].

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche è l'unica terapia per curare pazienti con malattie ematologiche benigne (talassemia major, anemia aplastica e anemia

falciforme) o pazienti con malattie autoimmuni che non rispondono alla terapia farmacologica. Questa procedura viene preceduta da radio-chemioterapia a dose massimali che sono gonadotossiche e causano sterilità nei pazienti trattati [5].

Ci sono poi sindromi genetiche associate ad una progressiva perdita della fertilità con l'aumentare dell'età. Le donne con sindrome di Turner, che possiedono solo un cromosoma X, hanno un rischio estremamente elevato di insufficienza ovarica prematura ed infertilità [6].

Gli uomini con sindrome di Klinefelter, che possiedono cromosomi X soprannumerari sono affetti da ipogonadismo, e spesso con l'avanzare dell'età diventano azoospermici. In più la terapia androgenica che viene somministrata a questi pazienti ne riduce la fertilità [7].

	♀	♂	Causa di sterilità/infertilità
Neoplasie	Neoplasie o malattie sistemiche	Neoplasie o malattie sistemiche	chemioterapia e radioterapia
Patologie benigne	Malattie autoimmuni: lupus eritematoso, sclerosi sistemica, vasculite, artrite reumatoide	Malattie autoimmuni: lupus eritematoso, sclerosi sistemica, vasculite, artrite reumatoide	Trattamenti gonadotossici (ciclofosfamide)
	Malattie ematologiche benigne: Talassemia major, anemia aplastica e anemia falciforme.	Malattie ematologiche benigne: Talassemia major, anemia aplastica e anemia falciforme	Chemio/radioterapia per il trapianto di midollo osseo
	Malattie autoimmuni che non rispondono ai farmaci	Malattie autoimmuni che non rispondono ai farmaci	
Patologie dell'apparato riproduttivo	Sindrome dell'ovaio policistico, endometriosi, cisti ovariche ricorrenti	Torsione del testicolo, varicocele, traumi	♀ (disfunzione dell'ovaio, POF, interventi chirurgici) ♂ (ipossia, danno al t. testicolare)
Sindromi genetiche	Sindrome di Turner	Sindrome di Klinefelter	Progressiva diminuzione delle cellule riproduttive

Tabella 1: Indicazione alla preservazione della fertilità in casi di malattie neoplastiche e benigne.

Tra le patologie benigne dell'apparato riproduttivo femminile che sono associate ad infertilità ci sono la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), l'endometriosi e le cisti ovariche ricorrenti [1]. La PCOS è una patologia endocrina, molto comune nelle donne in età riproduttiva; le caratteristiche principali includono la presenza, in un ovaio o in entrambi, di un elevata quantità di cisti, iperandrogenismo e disfunzioni ovariche (ovulazione irregolare o anovulazione) che causano infertilità [8].

L'endometriosi, invece, è una patologia cronica dovuta alla crescita anomala dell'endometrio, cioè il tessuto che ricopre la parte interna dell'utero; questo causa sanguinamenti ricorrenti, cicatrici e aderenze che, danneggiando il tessuto ovarico, possono portare alla POF. Inoltre la terapia chirurgica che viene proposta, nei casi di endometriosi grave, è associata con un elevato rischio di infertilità post-operatoria [9]. La presenza di cisti ovariche ricorrenti, poi, può essere associata ad infertilità per ragioni simili a quelle della sindrome dell'ovaio policistico. Anche in questo caso, se c'è la necessità di eliminare le cisti con un operazione chirurgica, resta un elevata probabilità di danneggiare il tessuto ovarico [10].

Per quanto riguarda il sesso maschile alcune patologie come il varicocele o la torsione testicolare così come eventi traumatici, possono andare a modificare il flusso sanguigno all'interno dei testicoli. L'ipossia che ne deriva diminuisce, nel testicolo, l'afflusso di nutrienti, il supporto di ossigeno e aumenta la temperatura causando danni al tessuto testicolare e alla spermatogenesi [11].

Le linee internazionali raccomandano gli esperti, in presenza di pazienti in età fertile o pre-pubere, di discutere il possibile rischio di infertilità/sterilità associato alle loro patologie o ai trattamenti farmacologici, e aiutarli nel scegliere il miglior procedimento per preservare la loro fertilità [12].

I trattamenti per preservare la fertilità nelle donne sono il congelamento di ovociti ed embrioni mentre per gli uomini il congelamento del liquido seminale. Per entrambi i sessi, le opzioni per bambini e adolescenti pre-puberi sono ancora sperimentali e includono: la criopreservazione del tessuto ovarico o del tessuto testicolare [12].

1.2 La criopreservazione dei gameti

La tecnologia della criopreservazione, sta continuando a svilupparsi dagli inizi del ventesimo secolo. Essa raggruppa quell'insieme di protocolli che permettono di conservare cellule e tessuti, diminuendo la temperatura, in maniera da bloccare le reazioni metaboliche nelle cellule [13].

Nel 1949 i biologi Polge, Parks e Smith riportarono il primo successo nel congelamento di spermatozoi con glicerolo[14]; negli anni successivi, in tutto il mondo, cominciarono a cercare di congelare tutti gli altri tipi di cellule come globuli rossi, ovociti e cellule della pelle [13]; fu sempre più chiaro che questa tecnica permetteva di conservare i campioni per un tempo illimitato senza comprometterne la vitalità una volta scongelati.

Tuttavia la discesa e la successiva risalita della temperatura durante il procedimento di congelamento/scongelo, spesso danneggia il tessuto poiché le cellule vengono esposte a diverse forze (termiche, chimiche e meccaniche) che interferiscono con la loro morfologia e funzionalità [15]. Infatti fattori fisici e chimici come: temperatura, pH, contenuto di ioni intracellulare, pressione osmotica e idrostatica si modificano fino a livelli non fisiologici durante congelamento e scongelamento; questo causa danni estesi alle membrane diminuendo il metabolismo cellulare e probabilmente altera anche il genoma [16].

Le principali cause di danno sono la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno delle cellule e il cambiamento della concentrazione dei sali sia all'intero sia all'esterno delle cellule.

Mazur nel suo lavoro del 1974 [17] dimostrò che un congelamento sufficientemente lento permette una progressiva disidratazione ed evita così la formazione di ghiaccio intracellulare. Al contrario, se la cellula viene congelata più rapidamente, il tempo per il trasporto di acqua al suo interno e l'equilibratura possono essere insufficienti e nella cellula si formano nuclei di ghiaccio. Uno scongelamento molto rapido, invece, riduce i danni da formazione di ghiaccio in quanto determina la formazione dei cristalli solo all'esterno della cellula.

Quindi, in linea teorica, per non danneggiare tessuti e cellule basterebbe: aumentare il grado di disidratazione cellulare, cambiare la velocità del processo di congelamento o scongelamento e aumentare la concentrazione totale di soluto con l'aiuto di differenti crioprotettori [16].

I crioprotettori (CPA) sono sostanze a diversa composizione chimica che hanno un'elevata solubilità in acqua e una tossicità direttamente proporzionale alla temperatura di utilizzo. Essi costringono l'acqua ad uscire dalle cellule per osmosi disidratando così la cellula.

Esistono due tipi di crioprotettori[18]:

- **crioprotettori penetranti** (glicerolo, etilenglicole EG, dimetilsolfossido DMSO e propandiolo PROH) i quali riescono ad attraversare la membrana cellulare, creando un gradiente osmotico, che porta alla fuoriuscita dell'acqua dalla cellula. Essi, inoltre abbassano il punto di congelamento della soluzione, prevengono l'esposizione della cellula alle alte concentrazioni di elettroliti intra e extracellulari e diminuiscono la formazione di cristalli di ghiaccio.
- **crioprotettori non penetranti** (zuccheri come saccarosio e fruttosio, amidi, lipoproteine e polivinilpirrolidone PVP) invece sono molecole di grandi dimensioni che restando all'esterno della cellula aumentano la concentrazione dei soluti extracellulari e creano un gradiente osmotico che fa fuoriuscire l'acqua.

Questo processo di disidratazione, indotto da entrambi i tipi di crioprotettori, porta però ad un cambiamento del volume cellulare e a shock osmotico causando così danni alla cellula [19].

Anche la procedura di scongelamento è una fase critica perché le cellule o i tessuti devono essere riportati a temperatura ambiente e i crioprotettori devono essere eliminati [16].

Quindi durante lo scongelamento le cellule, poste a temperatura ambiente, vengono esposte a concentrazioni di crioprotettore sempre più diluite così avviene la reidratazione; se questo processo avviene troppo lentamente l'acqua rimasta nella cellula può ricristallizzarsi formando cristalli di ghiaccio sempre più grandi [17]; oppure,

se la reidratazione avviene troppo velocemente, la cellula può rigonfiarsi fino a scoppiare [18].

Per ottenere una criopreservazione ottimale è necessario quindi trovare un equilibrio, sia durante il congelamento sia durante lo scongelamento, tra il tempo di esposizione al crioprotettore, la sua concentrazione e la temperatura di lavorazione. In questa maniera si può così evitare la tossicità dei CPA, minimizzare la formazione di cristalli di ghiaccio e ridurre lo shock osmotico [18].

Il principale problema è che questi fattori sono diversi per ogni tipo di cellula e anche nelle varie specie, rendendo quindi le sperimentazioni estremamente specifiche e non facilmente ripetibili [20].

Proprio per questo motivo la ricerca sulla criopreservazione è in continuo avanzamento, soprattutto nell'ambito della riproduzione medicalmente assistita.

In letteratura ci sono due principali protocolli per congelare tessuti e cellule: il congelamento lento e la vitrificazione.

1.2.1 Tecnica del congelamento lento

Con la tecnica del congelamento lento, che è stata la prima procedura di criopreservazione introdotta nella riproduzione medicalmente assistita [14], si usano basse concentrazioni di crioprotettori e congelatori programmabili che permettono di abbassare gradualmente la temperatura.

I protocolli sono praticamente gli stessi sviluppati per il topo nel 1972 dal gruppo di Whittingham [13]; il campione viene esposto per breve tempo a basse concentrazioni (1-2M) di crioprotettori, i più comunemente usati sono DMSO e PROH, per la classe dei CPA penetranti, e saccarosio come CPA non penetrante. Con l'aiuto di un congelatore programmabile inizia il lento raffreddamento del campione. Quando la temperatura arriva vicino al punto di congelamento (circa -6°C), l'operatore induce la formazione di un nucleo di ghiaccio nella soluzione extracellulare (*seeding*), così il ghiaccio si propaga man mano anche all'intero della cellula. Si continua poi a raffreddare lentamente il campione fino a -196°C , temperatura dell'azoto liquido nel quale infine vengono conservati i campioni [21].

Durante lo scongelamento invece si aumenta rapidamente la temperatura, da -196°C fino alla temperatura ambiente, e si espone il campione a concentrazioni progressivamente minori di crioprotettore [21].

Con questo metodo si ottiene una lenta disidratazione del tessuto e i cristalli di ghiaccio si formano nell'ambiente extracellulare, evitando così che si formino all'interno della cellula [18].

Questa tecnica è molto semplice ma ha lo svantaggio di dipendere, per la sua riuscita, da strumenti molto costosi e diverse ore per il completamento del processo; molto spesso quindi non è eseguibile in tutti i laboratori.

1.2.2 Tecnica di vitrificazione

La vitrificazione invece si basa sull'uso di concentrazioni molto alte di crioprotettori (6M) e un immediato passaggio dalla temperatura ambiente a -196°C , perché il campione viene immerso direttamente nell'azoto liquido [22]. Durante il processo di vitrificazione la viscosità delle soluzioni intra e extracellulari diminuisce la diffusività dell'acqua e immobilizza le molecole, in questo modo forma uno strato vitreo e l'acqua non ha il tempo di formare cristalli di ghiaccio [13].

Questa tecnica ha diversi vantaggi: è molto semplice e veloce da eseguire e non richiede particolari strumentazioni.

Esistono due principali svantaggi legati alla vitrificazione: il primo è che l'uso di elevate concentrazioni di CPA, anche se per un breve periodo, possono causare effetti di tossicità acuta. Una possibile soluzione è quella di mescolare diversi tipi di CPA diminuendo così le relative tossicità [23].

Il secondo svantaggio è la possibile trasmissione di agenti infettivi presenti nell'azoto liquido al campione; sono infatti riportati in letteratura alcuni casi di trasmissione virale da parte di azoto infetto a gameti ed embrioni [24]. Questo problema è stato risolto usando gli UV per sterilizzare l'azoto e usando sistemi chiusi, nei quali viene posto il campione, che permettono comunque di ottenere un raffreddamento ultra-rapido [25].

1.3 Criopreservazione di ovociti ed embrioni

La criopreservazione di ovociti ed embrioni è una tecnica standardizzata e sicura che viene eseguita nella maggior parte dei laboratori di procreazione medicalmente assistita ormai da trent'anni[16].

Per ottenere gli ovociti o embrioni sono necessarie due fasi della durata complessiva di circa 2-3 settimane [26]: nella prima fase alla paziente vengono somministrate delle gonadotropine, farmaci che inducono una crescita multipla di follicoli. Durante questa fase attraverso dei monitoraggi ecografici si valuta la crescita dei follicoli per decidere il momento migliore per il recupero di un numero congruo di ovociti. Durante la seconda fase la paziente viene sottoposta ad anestesia per effettuare il prelievo (*pickup*) degli ovociti mediante un ago con sonda ecoguidata [27].

Gli ovociti così ottenuti vengono congelati. Se la paziente decide invece di congelare embrioni si procede alla fecondazione degli ovociti maturi (metafase II) con il liquido seminale del partner o di un donatore, mediante la tecnica d'iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI) o la fecondazione in vitro (FIVET).

Dopo scongelamento, gli ovociti e gli embrioni, possono essere utilizzati solo per tecniche di fecondazione assistita e permettono quindi di preservare esclusivamente la funzione gametogenica [28].

Il congelamento di ovociti è una buona scelta per donne *single* o ragazze post-pubertà, che non hanno un partner o un donatore di sperma o per donne che non vogliono preservare embrioni per motivi religiosi o etici [29].

Uno dei problemi legati alla preservazione degli ovociti è che sono tra le cellule più grandi del nostro corpo e il loro alto contenuto di acqua le rende suscettibili alla formazione di ghiaccio intracellulare durante le procedure di congelamento/scongelamento [29]. La maggior parte degli ovociti quando vengono prelevati sono in metafase II; in questa fase dello sviluppo il fuso mitotico, che mantiene i cromosomi allineati sulla piastra equatoriale, è estremamente suscettibile. Uno dei maggiori danni da congelamento infatti, risulta essere la rottura del fuso mitotico che porta ad una non corretta segregazione dei cromosomi durante la successiva maturazione dell'ovocita [29].

Con i recenti sviluppi nei protocolli di congelamento però, la vitrificazione sta dando risultati promettenti. Più del 90-95% degli ovociti maturi sopravvivono dopo scongelamento e il tasso di fertilizzazione e di gravidanza è comparabile con quello delle cellule fresche [6].

Gli embrioni invece risentono meno del processo di congelamento/scongelamento perché le cellule essendo diploidi sono più resistenti [16]. L'alto tasso di successo e il tasso di gravidanza cumulativo superiore al 60%, rende questa tecnica il gold standard per la preservazione della fertilità nelle donne [26].

Il maggior limite di queste metodiche è che non possono essere eseguite [3]:

- nelle bambine e nelle ragazze prepubere che non possono essere sottoposte alla stimolazione ovarica
- nelle pazienti in cui il trattamento chirurgico/farmacologico non possa essere ritardato perché queste tecniche hanno una tempistica minima di 2/3 settimane
- nelle pazienti con neoplasie ormono-sensibili (es. carci-noma mammario) perché la stimolazione ovarica con estrogeni potrebbe portare a un peggioramento del tumore primario.
- nelle pazienti che non hanno un partner/donatore per quanto riguarda la criopreservazione di embrioni

1.4 Criopreservazione di tessuto ovarico

Con la criopreservazione del tessuto ovarico, pezzetti della parte corticale dell'ovaio, che contiene un gran numero di follicoli primordiali quiescenti, vengono prelevati durante una laparoscopia o laparotomia e congelati [18]. Il tessuto ovarico una volta scongelato può essere reimpiantato in un sito ortotopico o in un sito eterotopico: con il metodo ortotopico il reimpianto avviene all'interno della cavità pelvica sull'ovaio rimanente o nell'ambiente uterino; con il trapianto eterotopico avviene nel tessuto sottocutaneo dell'addome, dell'avambraccio, del muscolo retto, del seno e/o del tessuto sotto-peritoneale [30].

Dopo trapianto ortotopico c'è la possibilità che si instauri una gravidanza spontaneamente con l'eterotopico è necessario avvalersi delle tecniche di fecondazione assistita [31]. Fino ad oggi l'autotrapianto ortotopico di frammenti di corticale ovarica congelati/scongelati ha portato alla nascita di circa trentasette bambini, dal primo caso riportato in letteratura nel 2004 dal gruppo di Donnez [32].

Dopo trapianto eterotopico invece è stata riportata una sola gravidanza; questo probabilmente deriva dal fatto che i siti eterotopici non offrono un ambiente ottimale per lo sviluppo dei follicoli a causa della loro diversa temperatura, della diversa pressione e dall'assenza di specifici fattori paracrini [33].

I primi lavori in letteratura, riguardo la criopreservazione del tessuto ovarico, erano indirizzati verso la conservazione dell'intero ovaio [29]. Due complicazioni critiche: la difficoltà della ri-anastomosi vascolare delle arterie dell'ovaio e l'elevato rischio di ischemia post congelamento, hanno fatto cadere in disuso questa tecnica a favore del più facile e veloce congelamento dei frammenti di corticale [34].

Un altro possibile utilizzo del tessuto ovarico espantato è rappresentato dalla maturazione *in vitro* dei follicoli. I follicoli vengono isolati, si ottengono gli ovociti e si procede con la loro maturazione *in vitro* [28]. Questo procedimento può essere eseguito sia sul tessuto ovarico appena espantato e quindi si andrà a congelare direttamente gli ovociti, sia dopo aver crioconservato il tessuto e quindi si procede all'isolamento dei follicoli una volta scongelato.

I dati in letteratura sono molto limitati sull'argomento e fino ad oggi è stata documentata solo una nascita avvenuta nel 2014 [35]; questa tecnica promettente non sta dando i risultati attesi in quanto i tempi di maturazione dei follicoli, soprattutto quelli primordiali, sono molto lunghi ed inoltre si conosce ancora molto poco riguardo i fattori che inducono e influenzano la crescita follicolare [28].

Il congelamento di frammenti di corticale ovarica consente di preservare sia la funzione steroidogenica sia la funzione gametogenica, che si riattivano tra i 60 e i 240 giorni dopo il trapianto [30, 31]. La durata della funzione del tessuto ovarico scongelato e reimpiantato è ancora sconosciuta e dipende da molti fattori quali [30]: l'età della paziente al tempo dell'espanto, dalla riserva ovarica, dal metodo di congelamento usato, dal numero di pezzetti di tessuto che vengono ritrapiantati, dal

grado di ischemia dopo il reimpianto e dal numero di follicoli che sopravvive al reimpianto.

1.4.1 Metodi di congelamento del tessuto ovarico

Il tessuto ovarico può essere criopreservato sia con il congelamento lento sia con la vitrificazione; in letteratura i risultati sono molto discordanti, le indagini che vanno a comparare i due metodi sul tessuto ovarico umano sono limitate e gli autori presentano diverse conclusioni.

I primi studi sono stati eseguiti usando il congelamento lento, in quanto tecnica standard per congelare ovociti ed embrioni, ed effettivamente è con questo metodo che sono nati circa una trentina di bambini dopo aver trapiantato il tessuto [31].

Gandolfi *et al.* dimostra che il congelamento lento è più efficiente della vitrificazione [36] e permette di ottenere una miglior qualità follicolare [37]; Fabbri *et al.* identificano il congelamento lento come la tecnica standard da usare in ogni clinica anche se spesso comporta ampi danni alle cellule stromali dopo scongelamento [38].

Negli ultimi dieci anni con l'avvento della vitrificazione, vari gruppi hanno poi adattato protocolli per blastocisti e embrioni al tessuto ovarico con buoni risultati [15, 39].

Keros *et al.* nel suo studio dimostra che con la vitrificazione oltre a mantenere una sopravvivenza degli ovociti comparabile con quella del congelamento lento, si riescono a preservare meglio anche le cellule stromali [40].

Nel 2015 sono nati i primi due bambini da tessuto ovarico vitrificato da pazienti con insufficienza ovarica primaria [41].

Questa differenza nelle conclusioni dei vari lavori presenti in letteratura dipende dall'eterogeneità nei protocolli di criopreservazione applicati, dai metodi adottati per valutare la qualità del tessuto ovarico e dai tipi di cellule che sono stati analizzati [32].

Nonostante questi risultati incoraggianti, la criopreservazione del tessuto ovarico rimane ancora una procedura sperimentale e complessa. Un'adeguata tecnica di congelamento, infatti, deve essere in grado di mantenere l'integrità e la funzionalità di diversi tipi di cellule che compongono il tessuto; infatti ovociti, cellule della granulosa e cellule dello stroma hanno dimensioni e permeabilità all'acqua molto diverse tra loro.

Oltretutto, è complicato studiare le metodiche di criopreservazione a causa dell'accesso limitato al tessuto ovarico umano donato; vari studi hanno comparato diversi protocolli di criopreservazione usando tessuto ovarico umano e tessuto ovarico di bovini e suini, ma è apparso evidente che il tessuto umano si comporta in maniera diversa rispetto a quello animale e nessuna delle specie impiegate risultata essere un valido modello [36].

La criopreservazione di tessuto ovarico, quindi, ha dei vantaggi unici rispetto alle altre procedure di preservazione della fertilità (Tabella 2):

- non ritarda eventuali trattamenti terapeutici perché può essere eseguito immediatamente e in qualsiasi giorno del ciclo mestruale
- è sicuro per le pazienti con tumori ormono-dipendenti poiché non è necessario procedere con la stimolazione ovarica
- non è necessario che la paziente abbia un partner/donatore
- ristabilisce la fertilità e la funzione endocrina dell'ovaio dopo il trapianto
- è l'unico metodo esistente per preservare la fertilità di ragazze prepuberi e bambine

Il principale svantaggio di questa tecnica è la possibilità di reimpianto di cellule tumorali rimaste all'intero del tessuto ovarico nel caso in cui questa venga utilizzata in pazienti malate di cancro [42].

Le linee guida raccomandano di non sottoporre alla tecnica pazienti con tumori ad alto rischio di contaminazione a livello delle ovaie (tumori ematologici aggressivi) o con tumori per i quali non esistono marker affidabili da usare per una valutazione pre-impianto [12].

Tessuto/cellule	Vantaggi	Svantaggi
Ovociti	<ul style="list-style-type: none"> • bassa invasività • non è richiesto un partner • protocolli standardizzati 	<ul style="list-style-type: none"> • tempistiche lunghe per la stimolazione ovarica • controindicazioni per la stimolazione (tumori BRCA+) • basso numero di ovociti ottenuti • ovociti suscettibile al congelamento <p>NON APPLICABILE A BAMBINE</p>
Embrioni	<ul style="list-style-type: none"> • bassa invasività • protocolli standardizzati • alto tasso di sopravvivenza degli embrioni dopo scongelamento 	<ul style="list-style-type: none"> • tempistiche lunghe per la stimolazione ovarica • è necessario partner/donatore • controindicazioni per la stimolazione (tumori BRCA+) • problemi etici/religiosi <p>NON APPLICABILE A BAMBINE</p>
Tessuto ovarico	<ul style="list-style-type: none"> • rapido (non ritarda terapie) • sicuro per pazienti con tumori ormonosensibili • poco invasivo • mantiene funzione gametogenica e steroidogenica • ottiene elevato numero di follicoli primordiali 	<ul style="list-style-type: none"> • procedura sperimentale • pochi tessuti donati • protocolli non standardizzati • possibilità reimpianto cellule tumorali <p>APPLICABILE A BAMBINE</p>

Tabella 2: Confronto fra le strategie di preservazione della fertilità.

1.4.2 Valutazione dell'efficienza della criopreservazione del tessuto ovarico

Il miglior metodo per valutare la riuscita della criopreservazione del tessuto ovarico, e quindi aver preservato la fertilità della paziente, è rappresentato dal suo reimpianto seguito da gravidanza e nascita di un bambino. Chiaramente per avere questo risultato è necessario molto tempo e solo alcune cliniche nel mondo sono oggi in grado di poter usare questa procedura, ancora sperimentale, sulle pazienti e seguirle nel loro follow-up [12].

Nei primi lavori sul tessuto ovarico che si trovano in letteratura, si valutava la morfologia dei follicoli dopo averli isolati enzimaticamente dal tessuto scongelato [43]. Questo metodo però mostrava alcune criticità : i follicoli distrutti o lisi erano impossibili da isolare, con la digestione enzimatica si andava a danneggiare i follicoli più suscettibili e quindi si sovrastimavano gli ovociti sopravvissuti [44].

Un altro metodo di valutazione per la riuscita della criopreservazione sono i saggi di vitalità; spesso questi saggi usano dei semplici coloranti (trypan blue) e il risultato si basa sul concetto dell'esclusione: se le cellule sono vive e con membrana intatta i coloranti non vengono captati, mentre se le cellule sono morte o danneggiate permeano al loro interno [23].

Anche queste metodiche hanno delle limitazioni perché i pezzi di tessuto devono essere molto piccoli per assorbire in maniera adeguata il colorante e in caso di coloranti nucleari si rischia di sopravvalutare la vitalità follicolare perché spesso si colorano indistintamente anche i nuclei delle cellule della granulosa e dello stroma [23].

Per ovviare a questi problemi si è cominciato a studiare istologicamente l'intero tessuto in maniera da valutare la percentuale di follicoli morfologicamente intatti e quelli degenerati [23]. Le analisi istologiche e ultrastrutturali del tessuto, sono ad oggi i metodi più usati [45] perché permettono di ottenere sia una panoramica generale sulle condizioni del tessuto, con la microscopia ottica, sia informazioni a livello ultrastrutturale, con il microscopio elettronico a trasmissione [40]. Con questi metodi è possibile rilevare i danni e le alterazioni morfologiche causate dalla criopreservazione su ovociti, cellule della granulosa e cellule stromali [46, 47].

Altri metodi comunemente usati in letteratura per valutare il tessuto dopo le procedure di congelamento sono: i test di apoptosi come il TUNEL test [46] o le analisi immunohistochimiche che permettono di valutare marker apoptotici come p53, p21 e Apaf-1 [48]

1.4.3 Nuove microscopie avanzate per la valutazione del tessuto ovarico

Negli ultimi decenni sta emergendo la possibilità di affiancare alle tecniche di microscopia tradizionale (LM e TEM) delle tecniche avanzate come le spettromicroscopie a raggi X; tra queste, quelle con la maggior sensibilità e risoluzione spaziale sono la spettroscopia a fluorescenza di raggi X da radiazioni di sincrotrone (SB-XRF) e la spettroscopia a raggi X indotta da protoni (PIXE).

L'energia richiesta per produrre i raggi X può essere fornita da elettroni, protoni o fasci di fotoni [49].

In confronto agli elettroni, usati per esempio nella TEM, i raggi X hanno un potere di penetrazione molto elevato, questo rende possibile determinare, a livello subcellulare, la distribuzione degli elementi chimici nei campioni biologici andando a valutare la concentrazione degli elementi anche in tracce [50]. Andando quindi a misurare gli elementi chimici *in situ* è possibile capire e studiare i processi biochimici che avvengono all'interno delle cellule [49].

Il principio fisico sul quale si basano queste tecniche è l'effetto fotoelettrico (Figura 1): usando una radiazione con energia appropriata è possibile scalzare l'elettrone del guscio più interno di un atomo; questa posizione verrà poi occupata da un elettrone dei gusci più esterni che emetterà un fotone con energia pari alla differenza tra l'energia iniziale e finale. L'energia prodotta è caratteristica di ogni singolo elemento, inoltre le energie di emissione di tutti gli elementi sono tabulate e questo permette l'identificazione della composizione degli atomi che costituiscono il campione [51].

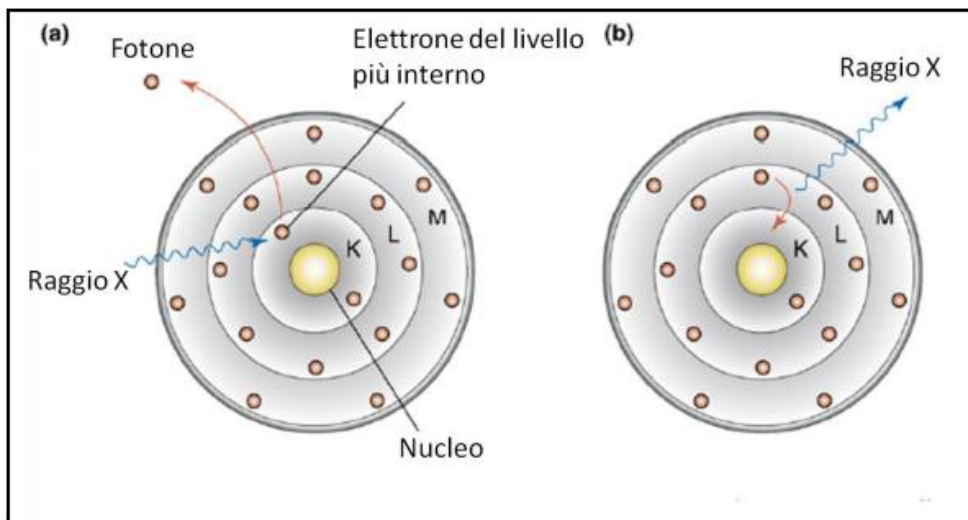


Figura 1: Modello atomico di Bohr che illustra l'effetto fotoelettrico. (a) L'eccitazione da parte dei raggi X porta al rilascio di un elettrone da un livello energetico interno dell'atomo. (b) L'assenza che si viene a creare viene occupata da un elettrone appartenente ad un livello energetico più alto, processo che comporta l'emissione di un fotone.

Quindi quando un fascio di raggi X penetra in un campione vengono prodotti dei fotoni con emissione caratteristica che sommati formano uno spettro nel quale ad ogni picco corrisponde un elemento [50].

È inoltre possibile completare l'analisi chimica degli elementi, ottenuta dalla fluorescenza a raggi X, con delle immagini in contrasto di fase e in assorbimento che permettono di visualizzare la struttura morfologica con altissima definizione [52].

Con la spettroscopia XRF (Figura 2) si analizza l'emissione della fluorescenza X caratteristica emessa dal campione, dopo averlo bombardato con una radiazione di Sincrotrone. La radiazione di sincrotrone è una radiazione elettromagnetica prodotta da particelle cariche che viaggiano a velocità prossime alla velocità della luce. Le particelle sono immerse in campi magnetici o elettrici che le forzano a circolare in percorsi chiusi, mantenendo costante la loro energia. L'intensità della radiazione emessa è inversamente proporzionale alla massa delle particelle accelerate; per questo motivo solo elettroni e positroni sono considerati come possibili sorgenti di luce di sincrotrone [53].

I raggi X trasmessi e la fluorescenza X vengono registrati contemporaneamente da una fotocamera CCD (Charge Coupled Device) e dai rilevatori SSD. I raggi X emessi dal campione vengono quindi registrati pixel per pixel e grazie ad opportuni software si costruisce una microradiografia (mappa di assorbimento) dell'area scansionata [54].

Le mappe di assorbimento risultanti permettono di identificare gli elementi che compongono il campione e forniscono informazioni semi-quantitative perché l'intensità della fluorescenza è proporzionale alla concentrazione degli elementi presenti [51]. È importante ricordare che la microscopia XRF consente di mantenere la morfologia del campione durante l'analisi ed è quindi una tecnica adatta ad analizzare campioni biologici [50].

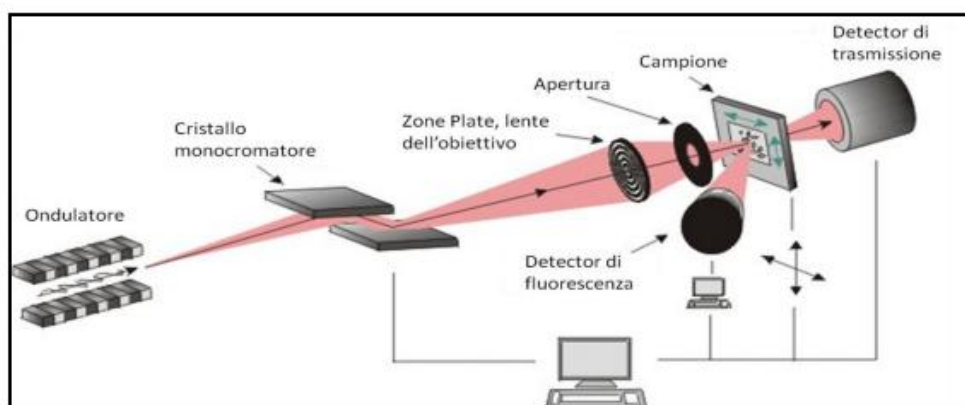


Figura 2 Schema rappresentativo degli elementi di un microscopio a fluorescenza da raggi X.

Presso l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) di Grenoble in Francia, c'è una linea di luce chiamata ID21, dove è possibile fare analisi di spettromicroscopia a raggi X e in particolare di fluorescenza da raggi X. Quest'ultimo sistema permette la localizzazione e la quantificazione di diversi elementi nei campioni istologici e cellulari. L'intervallo di energie in cui lavora ID21 è compreso tra i 2000 e 9200 eV quindi permette di rilevare un gran numero di elementi (Figura 3); dal sodio al ferro, dal gallio al bario e il gadolinio[55].

A Trieste, nell'Area Science Park di Basovizza, si trova il Sincrotrone Italiano di Elettra. Presso la linea di luce TwinMic è possibile fare analisi con la microscopia in trasmissione a raggi X e contemporaneamente l'analisi della fluorescenza caratteristica X [53]. L'energia utilizzata a TwinMic è più bassa rispetto a quella di ID21, infatti, va da 200 a 2000 eV; questo permette di ottenere informazioni sulla distribuzione degli elementi a più basso peso molecolare (Figura 3).

Inoltre, attraverso le immagini di assorbimento e contrasto di fase, la microscopia a trasmissione permette uno studio morfologico del campione con una risoluzione spaziale dieci volte più elevata di quella della microscopia tradizionale [52].

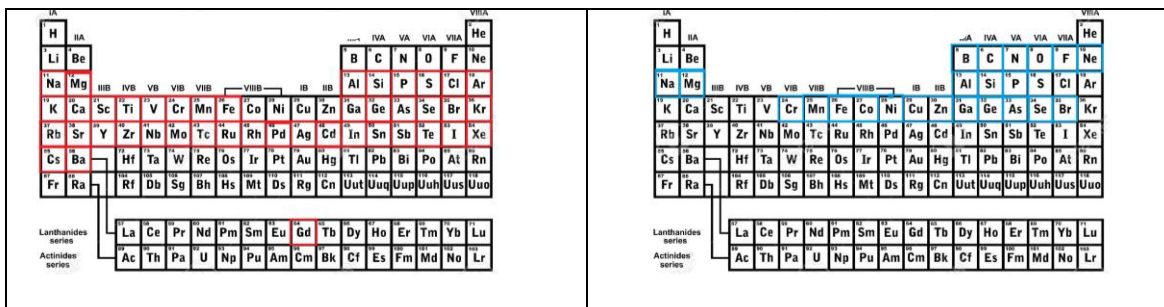


Figura 3: Elementi accessibili alla fluorescenza da raggi X nella linea di luce ID21 (destra). Elementi accessibili alla fluorescenza da raggi X a TwinMic (sinistra).

Le tecniche che invece usano i protoni come fonte di energia hanno due importanti vantaggi: un'alta risoluzione spaziale, perché la grandezza del fascio di particelle è di circa 1 μm di diametro e una più agevole valutazione quantitativa delle concentrazioni degli elementi. Proprio per questo motivo vengono usate per studi di farmacologia, fisiologia e tossicologia [49].

Nella PIXE si usa un fascio di protoni, accelerati a 2-4 MeV, per eccitare il campione e anche in questo caso si va ad analizzare e quantizzare i raggi X caratteristici che vengono emessi dal campione [56]. PIXE è una tecnica multi-elemento che offre una buona sensibilità per gli elementi con numero atomico tra $20 < Z < 35$ e $75 < Z < 85$, quindi tutti gli elementi più pesanti del manganese e dell'alluminio [56]. Questa caratteristica la rende adatta a determinare elementi chimici di interesse biologico come gli elementi essenziali (Mn, Fe, Cu, Zn), i metalli pesanti tossici (Hg, Pb) o composti farmacologici (Pt) [49].

PIXE è una tecnica veloce, non distruttiva e con un basso segnale di background che permette di identificare gli elementi anche in campioni molto piccoli; infatti la risoluzione spaziale è di pochi micrometri e il limite di rilevazione è nell'intervallo dei $\mu\text{g g}^{-1}$ [49, 56].

1.5 Criopreservazione del liquido seminale

La criopreservazione del liquido seminale, introdotta per la prima volta nel 1960, ormai è parte integrante delle tecniche di riproduzione assistita.

Oltre che per i pazienti affetti dalle patologie citate in precedenza, che portano a sterilità, viene anche usata per pazienti che devono sottoporsi a vasectomia, pazienti affetti da azoospermia secretoria o escretoria che accedono alle tecniche di Fecondazione Assistita, pazienti afferenti alla PMA che scelgono di congelare preventivamente il liquido seminale per evitare inconvenienti dovuti alla mancata produzione (stress, emotività, indisponibilità fisica al momento del prelievo ovocitario) e infine per preservare la fertilità in individui che sono esposti ad agenti esterni (agenti tossici, calore) che possono influire sulla gametogenesi [18].

Il metodo più comunemente usato per congelare gli spermatozoi è la vitrificazione, proposto da Sherman nel 1990. Il liquido seminale viene mescolato, goccia a goccia, con un eguale volume di crioprotettore e posto in particolari cannuce chiamate *paillettes*. Ogni *paillette* viene sigillata tramite termosaldatura ad entrambe le estremità e viene mantenuta a temperatura ambiente così da far equilibrare la soluzione e far permeare il crioprotettore all'intero degli spermatozoi. Le *paillettes* sono poi poste a 10-15 cm dall'azoto liquido, in maniera da farle raffreddare nei vapori di azoto (-80 C°) per 10 minuti e poi immerse direttamente nell'azoto liquido (-196 C°). Lo scongelamento avviene mantenendo le *paillettes* a temperatura ambiente per una decina di minuti, poi si estrae il liquido seminale con una siringa e infine si procede con l'eliminazione del crioprotettore lavando e centrifugando più volte il campione [18].

Esistono, anche per il liquido seminale, dei protocolli che utilizzano il congelamento lento usando i congelatori programmabili; vari autori sostengono però che proprio usando questo protocollo si formano cristalli di ghiaccio intracellulari che vanno a danneggiare gli spermatozoi [57]; per questo motivo la vitrificazione resta la metodica più utilizzata.

Il crioprotettore più usato per congelare il liquido seminale è il glicerolo perché preserva lo spermatozoo dalla disidratazione, dalla perdita di sali, dallo shock termico

e infine consente di conservare bene sia la struttura delle membrane sia il metabolismo cellulare[18].

In comparazione con le altre cellule, gli spermatozoi, potrebbero sembrare più resistenti al processo di congelamento/scongelo perché possiedono un'elevata fluidità delle membrane e un basso contenuto d'acqua (50%). Ciononostante è noto che la criopreservazione causa anche negli spermatozoi svariati danni, diminuendo la loro motilità del 30-50%, alterando la loro struttura/funzione e diminuendo la loro capacità fecondante [16].

Il peggioramento della qualità del liquido seminale post-congelamento dipende dalle caratteristiche biochimiche iniziali del campione e dalla tecnica di congelamento utilizzata. Infatti, migliori sono le caratteristiche iniziali degli spermatozoi, migliori saranno i risultati in termini di recupero di spermatozoi mobili [57].

Nei pazienti nei quali non si possono ottenere spermatozoi eiaculati: pazienti con azoospermia non ostruttiva, oligozoospermia severa, necrozoospermia o con problemi di eiaculazione, esiste la possibilità di crioconservare gli spermatozoi estratti da biopsie di tessuto testicolare (TESE).

Durante la TESE la biopsia del testicolo viene posta in una piastra Petri con terreno di coltura, viene sminuzzata con un bisturi e si osserva al microscopio se sono presenti gli spermatozoi. Nell'eventualità siano presenti si trasferiscono con il terreno di coltura in una provetta sterile dove si aggiunge il crioprotettore e si procede al congelamento come per il liquido seminale *in toto* [58].

Una volta crioconservati, gli spermatozoi provenienti da eiaculato o da biopsia testicolare, possono essere utilizzati solo per le tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita.

Attualmente, per i bambini e i pazienti pre-puberi, i gameti si possono ottenere solo attraverso una TESE; spesso però questi spermatozoi risultano immaturi e quindi non utilizzabili. Per ovviare a questa problematica si sta espandendo un nuovo campo della ricerca volto allo studio della criopreservazione del tessuto testicolare, che per ora è ancora una tecnica sperimentale [59].

Così come per il tessuto ovarico, stanno cercando di congelare il tessuto testicolare, ricco di spermatogoni, per poi poterlo reimpiantare o per utilizzarlo per la maturazione *in vitro* degli spermatozoi immaturi. Anche se il completamento della spermatogenesi

in vitro appare per ora una possibilità remota, i recenti successi raggiunti nei roditori e nel tessuto umano sono molto incoraggianti [59].

Un'altra metodica sperimentale che sta ottenendo un elevato tasso di successo, nei roditori e nei primati, è l'autotrapianto di spermatogoni staminali (SSC) che vengono iniettati nella *rete testis* dei testicoli. Sembra che queste cellule staminali riescano a ricolonizzare il testicolo riavviando la spermiogenesi [59].

1.5.1 Danni da crioconservazione nel liquido seminale e metodi di valutazione

I principali danni causati dal congelamento che avvengono negli spermatozoi sono: modificazione della struttura e dell'integrità delle membrane cellulari, alterazione della funzione degli organelli e danno al DNA [60].

Lo strato più esterno della membrana plasmatica dello spermatozoo è formato dal glicocalice: una zona costituita da carboidrati legati covalentemente alle proteine e ai lipidi di membrana che sono rispettivamente le glicoproteine e i glicolipidi. Il glicocalice ha una funzione protettiva per la cellula ed è importante per il riconoscimento cellula-cellula [57].

La criopreservazione spesso causa un cambiamento nella composizione del glicocalice; questo porta ad un'alterazione della funzione delle proteine di membrana responsabili, sia dell'azione acrosomiale sia dell'iniziale interazione con l'ovocita; in questo modo si riduce l'abilità fertilizzante dello spermatozoo [61].

Tra gli organelli intracellulari, quelli che più risentono del congelamento, sono i mitocondri che attraverso la fosforilazione ossidativa sintetizzano l'ATP, lo trasferiscono ai microtubuli e attivano così la motilità degli spermatozoi. Le alterazioni che avvengono durante il congelamento, a livello della membrana mitocondriale, diminuiscono la funzionalità dell'intero mitocondrio e questo spiega la riduzione di motilità negli spermatozoi scongelati [57].

Nel caso ancora peggiore in cui la membrana mitocondriale si rompa, vengono liberati i radicali liberi dell'ossigeno (ROS) che, inducendo il danno perossidativo, vanno a loro volta a danneggiare tutte le altre membrane spermatiche iniziando quindi un circolo vizioso di danneggiamento alla cellula [62].

Per quanto riguarda il danno al DNA indotto durante la criopreservazione, i dati in letteratura sono molto discordanti. Alcuni gruppi descrivono alterazioni all'integrità del DNA dopo criopreservazione [63-65], altri invece non riportano alcun danno a livello degli acidi nucleici [66].

Ad esempio Zribi *et al.*, nel suo lavoro, descrive un aumento della frammentazione e dell'ossidazione del DNA sia su pazienti fertili che infertili dopo il congelamento del liquido seminale [64], mentre Kadirvel *et al.*, che valuta il liquido seminale di toro dopo averlo congelato, rivela un aumento dei radicali liberi dell'ossigeno e della perossidazione lipidica ma non un danno diretto al DNA [66].

Questa discrepanza nei risultati è dovuta probabilmente alla differente crioresistenza iniziale dei campioni, ai diversi protocolli di criopreservazione usati e alle diverse tecniche impiegate per valutare l'integrità del DNA [16].

Mentre il dibattito continua riguardo la presenza o l'assenza degli effetti della criopreservazione sul DNA degli spermatozoi, negli ultimi anni sono stati pubblicati molti studi, condotti soprattutto sugli animali, atti a chiarire i possibili meccanismi coinvolti nel criodanno agli acidi nucleici.

Sono emersi tre principali meccanismi che generano le alterazioni al DNA durante il congelamento e sono: i radicali liberi dell'ossigeno (ROS), l'apoptosi e i cambiamenti di pressione osmotica.

Già in uno studio del 1995 [16] era stato scoperto che i liquidi seminali di uomini fertili contenevano una quantità significativamente più alta di enzimi antiossidanti rispetto a quelli di uomini infertili, rendendoli anche meno suscettibili ai danni da criopreservazione.

Sono molti i lavori che dimostrano che i ROS danneggiano il DNA [16, 64] ed infatti aggiungendo antiossidanti nei crioprotettori (melatonina, vitamina E, taurina) si diminuisce il danno al DNA causato dal congelamento [65, 67].

Durante la criopreservazione un altro meccanismo che aumenta la frammentazione del DNA è l'apoptosi che viene indotta sia dai ROS che dalle endonucleasi che si liberano a causa della rottura delle membrane [64].

Recenti studi, su liquido seminale di koala, hanno poi dimostrato che i cambiamenti osmotici che avvengono durante il congelamento/scongelo provocano

un'iniziale rilassamento della cromatina con una sua successiva supercondensazione; questo provoca la frammentazione del DNA in alcuni punti [68].

Con degli esperimenti *in vitro* si è visto che, il DNA degli spermatozoi congelati si decondensa con più difficoltà in presenza di un agente denaturante [16]; questo indica che probabilmente avviene un cambiamento nei ponti disolfuro e nel relativo meccanismo di rimodellamento del DNA che è di vitale importanza per una cella germinale come lo spermatozoo.

I metodi comunemente usati per valutare gli effetti della criopreservazione sul liquido seminale sono: la valutazione della concentrazione e della motilità degli spermatozoi come suggerisce il manuale della World Health Organization 2010 [69].

È noto che entrambi questi parametri peggiorano dopo lo scongelamento e la motilità diminuisce di circa il 50% [70].

È emerso da vari studi che i parametri standard per valutare il liquido seminale (concentrazione, motilità, vitalità, morfologia), non sono dei buoni predittori riguardo la competenza funzionale dello spermatozoo e quindi la riuscita di una gravidanza [71]. Risulta così necessario affiancare alle analisi standard anche dei test per la valutazione del danno al DNA [72].

Negli anni sono state sviluppate un gran numero di tecniche per verificare l'integrità del DNA. I meccanismi coi quali il DNA nemaspermico viene valutato in questi test varia, alcuni misurano le anomalie nella struttura della cromatina mentre altri valutano direttamente le rotture del filamento di DNA [73].

La toluidina blu è un colorante basico usato per valutare l'integrità della cromatina. Esso si lega ai residui fosfato del DNA degli spermatozoi quando la cromatina è poco compatta o il DNA è danneggiato; quindi, usando un microscopio ottico, si possono discriminare gli spermatozoi danneggiati che si colorano di blu dagli spermatozoi normali che restano incolore [73].

Il TUNEL test (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) identifica in modo diretto le rotture del DNA; gli spermatozoi vengono fatti reagire con la TdT (deossinucleotidil-transferasi-terminale), un enzima che incorpora basi marcate con un fluoroforo (dUTP) nei filamenti rotti di DNA singoli o doppi. Usando quindi un microscopio a fluorescenza o un citofluorimetro si possono distinguere gli spermatozoi danneggiati possono essere identificati [74].

Anche l'elettroforesi a singola cellula, o test di COMET, riconosce in modo diretto i danni al DNA; gli spermatozoi vengono inglobati nel gel di agarosio, lisati con soluzioni saline ad alta concentrazione, sottoposti ad una corsa elettroforetica, colorati con un colorante fluorescente che si lega al DNA e infine valutati con un software per immagini. Il DNA frammentato che ha un basso peso molecolare migra durante l'elettroforesi e forma una caratteristica 'coda della cometa', mentre il DNA ad alto peso molecolare non migra. Grazie a dei software che analizzano le immagini è possibile misurare la lunghezza della 'coda' e l'intensità della fluorescenza [75].

Il test SCD è basato sull'induzione della condensazione che è direttamente correlata con la frammentazione del DNA. Gli spermatozoi vengono immersi nell'agarosio, denaturati con una soluzione acida e infine trattati con una soluzione di lisi che rimuove le membrane e le proteine; restano così visibili i nucleoidi che sono formati: da un nucleo centrale e da un alone periferico di DNA disperso. Al microscopio si va a misurare l'alone che si forma in quanto: le cellule con DNA intatto formano un grande alone, mentre le cellule danneggiate formano aloni molto piccolo o non lo formano affatto [73].

Il test con arancio di acridina (AO) si basa sulla premessa che il DNA degli spermatozoi con alterazioni nella cromatina è più suscettibile alla denaturazione acida [73].

L'AO è un fluorocromo che intercala il DNA a doppio filamento sotto forma di monomero, mentre si lega al DNA a singolo filamento come un aggregato. Quindi, con un microscopio a fluorescenza, si discriminano gli spermatozoi danneggiati che sono rossi dagli spermatozoi intatti che risultano verdi [75]. Il test SCSA è un saggio con arancio di acridina nel quale il cambiamento di fluorescenza viene valutato con un citofluorimetro [16].

1.5.2 Nuovi approcci per valutazione del danno al DNA

Negli ultimi anni si evidenzia sempre più la necessità di nuove procedure analitiche che permettano di valutare contemporaneamente diversi parametri del liquido seminale; queste tecniche devono essere, non invasive e non distruttive, in maniera da mantenere la vitalità delle cellule e il loro potenziale di fertilità per assicurare

un'efficiente selezione degli spermatozoi per le successive tecniche di fecondazione assistita.

Recentemente alcuni gruppi, a questo scopo, hanno iniziato ad usare le spettroscopie vibrazionali [76]. La spettroscopia vibrazionale include due tecniche analitiche: la spettroscopia infrarosso e la spettroscopia Raman; con queste tecniche si analizzano le transizioni vibrazionali, che derivano dai legami chimici presenti nei campioni, provocate da una radiazione elettromagnetica che si usa come sorgente.

Lo spettro infrarosso del campione che si ricava è unico, simile ad un'impronta digitale e permette di ottenere informazioni sulla composizione molecolare del campione, sulla sua struttura e le interazioni al suo interno [77].

1.5.2.1 Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman è una tecnica analitica basata sull'effetto Raman che usa come fonte di energia una sorgente monocromatica con lunghezza d'onda nell'ultravioletto [77]. Quando i fotoni interagiscono con le molecole del campione vengono diffusi in due modi:

- diffusione elastica quando avviene senza trasferimento netto di energia perché i fotoni diffusi hanno la stessa energia di quelli incidenti: diffusione di Rayleigh
- diffusione anelastica quando i fotoni diffusi hanno un'energia maggiore (linee Stokes) o minore (linee anti-Stokes) a quelli incidenti e quindi c'è un trasferimento di energia dal fotone al campione o viceversa: effetto Raman

Lo spettro Raman è quindi caratterizzato da tre segnali: la radiazione Rayleigh, i segnali delle linee Stokes e i segnali delle linee anti-Stokes; in realtà si vanno a valutare solo i segnali delle linee Stokes perché sono quelli che danno le informazioni sui gruppi funzionali delle molecole e sui loro stati vibrazionali [78].

D'Amico *et al.* [79] nel suo lavoro ha dimostrato che con la spettroscopia di risonanza Raman è possibile valutare la presenza di danni al DNA nel liquido seminale; lo svantaggio è però che bisogna usare un campione estremamente concentrato e purificato.

In teoria quindi, con la microspettroscopia Raman, la qualità del liquido seminale può essere valutata a livello di singola cellula fornendo informazioni sullo stato del DNA nucleare e identificando i danni e le porzioni dove sono avvenute le frammentazioni [80]; oltretutto con questa metodica le procedure per la preparazione del campione sono molto semplici al contrario di altre microscopie usate comunemente.

Il maggiore svantaggio di questa tecnica però consiste nel foto-danno cioè il danno indotto dalla luce laser al materiale biologico; esso limita il potenziale uso della Raman nella PMA in quanto non sarebbe possibile discriminare il danno intrinseco del campione da quello causato dalla luce [78].

1.5.2.2 Spettroscopia a infrarosso

Nella spettroscopia ad infrarosso (IR) si usano come sorgente dei fotoni infrarosso. Se la radiazione infrarosso viene assorbita dal campione, gli stati di energia vibrazionale delle molecole del campione passano da uno stato vibrazionale fondamentale ad uno stato eccitato. Si forma quindi uno spettro di assorbimento nel quale ad ogni picco equivale una transizione di stato [77].

Sanchez *et al.* [76] in un recente studio compara la spettromicroscopia Raman alla FTIR per valutare la qualità degli spermatozoi in campioni a secco. Tra le tante tecniche di spettroscopia vibrazionale, la FTIR è un valido strumento analitico nella ricerca medica e biologica perché permette di identificare le proprietà vibrazionali fornendo informazioni dettagliate sulla composizione biochimica e sulla struttura delle biomolecole del campione; per questa tecnica i campioni si preparano velocemente e non serve usare marker esterni.

La spettromicroscopia FTIR ha però un grosso svantaggio rispetto alla Raman e cioè la bassa risoluzione laterale dello strumento che impedisce di lavorare su singola cellula. Tuttavia, la radiazione infrarossa riscalda molto poco il campione e quindi non induce danni. Questo vantaggio rende quindi la FTIR la tecnica migliore per monitorare i cambiamenti dovuti a diversi stress nelle cellule *in vivo* [81-83].

Al Sincrotrone di Elettra (Trieste), presso la linea di luce SSSI è possibile effettuare analisi di spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR) (Figura 4); il range spettrale rilevabile va da 500 a 5000 cm^{-1} con una risoluzione spaziale di 4 μm [53].

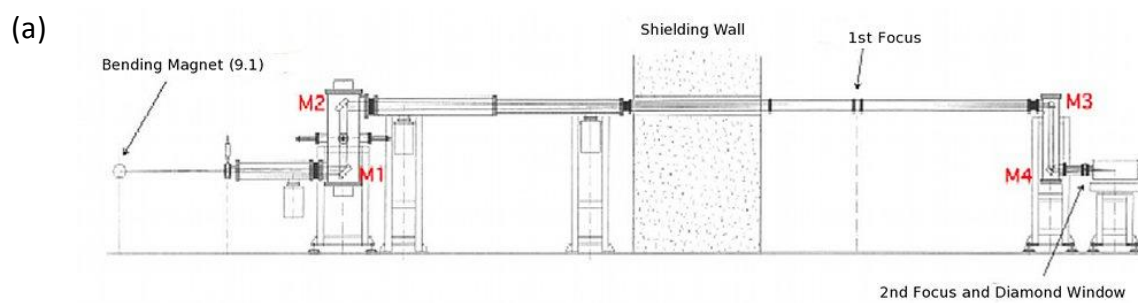


Figura 4: Rappresentazione schematica (a) e immagine dello spettroscopio ad infrarosso (b) della linea di luce SSSI presso il Sincrotrone di Elettra, Trieste.

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo dello studio è stato la messa a punto di un protocollo ottimale di congelamento/scongelo di tessuto ovarico che consenta di preservare l'integrità morfologica e funzionale del tessuto; sono state confrontate le tecniche di congelamento lento e vitrificazione comparando in parallelo due protocolli sul tessuto ovarico umano proveniente da una stessa paziente. Gli eventuali danni a carico della morfologia e delle ultrastrutture del tessuto ovarico, causati dai processi di congelamento/scongelo, sono stati valutati usando la microscopia ottica (LM) e la microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

Per meglio comprendere da un punto di vista biochimico i danni al tessuto indotti dal congelamento, alle microscopie tradizionali è stata affiancata una tecnica di microscopia avanzata, la microscopia a fluorescenza a raggi X (XRF).

Per quanto concerne la preservazione dei gameti maschili, lo scopo dello studio è stato quello di valutare la fattibilità di nuovi approcci di spettroscopia per valutare il danneggiamento al DNA dopo congelamento; con uno studio preliminare, inducendo un danno ossidativo, è stato verificato se la spettroscopia infrarossa (FTIR) può essere usata per identificare il danno al DNA negli spermatozoi.

Per capire, infine, se il danno al DNA indotto dalla criopreservazione può essere valutato con la FTIR, è stato fatto un confronto tra il danno al DNA indotto dal congelamento e quello causato dallo stress ossidativo utilizzando una metodica tradizionale, l'arancio di acridina.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Reclutamento delle pazienti e raccolta campioni di tessuto ovarico

Il tessuto ovarico è stato ottenuto, previa compilazione del consenso informato, da nove pazienti con un'età media di 37,8 anni (*range* 27-45); le biopsie le cui dimensioni erano in media (5 cm x 2 cm) derivano da interventi in laparoscopia di asportazione parziale o totale dell'ovaio, per patologia benigna presso l' I.R.C.S.S Burlo Garofolo di Trieste. Per ogni paziente il campione di tessuto ovarico è stato analizzato al momento dell'asportazione (t0- tessuto fresco) e dopo congelamento/scongelo (t1), in maniera da minimizzare la variazione tra pazienti.

3.2 Trattamento della biopsia

La biopsia è stata immediatamente immersa in una Falcon da 50 mL contenente 20 mL di SynVibro®Flush (Origio) a 37°C; entro pochi minuti dalla raccolta il tessuto ovarico è stato trasferito in una piastra di coltura e, tramite bisturi, la parte midollare è stata eliminata dalla corticale che è poi stata tagliata in pezzettini di 1-2 mm di spessore e 5 mm di larghezza, come si può vedere nella Figura 5.

Per ogni paziente (Figura 5) un pezzo di tessuto ovarico fresco (t0) è stato immediatamente fissato e usato come controllo per le successive valutazioni al microscopio ottico (LM) ed elettronico a trasmissione (TEM).

I pezzetti di tessuto rimanenti sono stati congelati con i due metodi di criopreservazione: la vitrificazione e il congelamento lento e mantenuti in azoto liquido per 3-6 mesi prima dello scongelamento. Dopo lo scongelamento, le biopsie sono state fissate per le analisi al LM e TEM (t1).



Figura 5: Flow-chart del disegno dello studio (destra), pezzetti di corticale ovarica durante il trattamento con i protocolli. (sinistra)

3.3 Protocolli di crioconservazione

3.3.1 Congelamento Lento e scongelamento

La corticale ovarica è stata congelata usando un kit commerciale per il congelamento lento degli embrioni, contenente un tampone con colina (SAGE® Choline Substituted Cryopreservation, ART-8017, CooperSurgical Company, Trumbull, CT, USA).

Il tessuto ovarico è stato incubato nelle cryovials con 2 mL di terreno pre-riscaldato contenente 137 mmol/l cloruro di colina, 1.5 mol/l 1,2-propanediolo, 0.3 mol/l saccarosio e 20% di sostituto del siero sintetico (SSS) in HTF-HEPES per 30 minuti a temperatura ambiente; successivamente le cryovials sono state trasferite nel congelatore programmabile (Planer) e hanno seguito il seguente protocollo di raffreddamento :

- abbassamento della temperatura da 22°C a -7°C a una velocità di 2°C/min
- mantenimento a -7°C per 5 minuti
- seeding manuale e mantenimento alla stessa temperatura per 10 minuti
- raffreddamento a -35°C a una velocità di 0,3°C/min
- trasferito in un contenitore di azoto liquido per la conservazione (-196°C)

Le strip di tessuto sono poi state scongelate con il kit SAGE® CSC Thawing Medium Kit (ART-8018, CooperSurgical Company, Trumbull, CT, USA). Le cryovials sono state inizialmente mantenute all'aria per 40 secondi e poi immerse in acqua a 35°C fino a quando il ghiaccio non si è completamente sciolto. Poi il campione è stato incubato per 10 minuti rispettivamente in 2 mL di CSC Thawing Medium 1 (137 mmol/l cloruro di

colina e 0.5 mol/l saccarosio in HTF-HEPES) e in 2 mL di CSC Thawing Medium 2 (137 mmol/l cloruro di colina and 0.2 mol/l saccarosio in HTF-HEPES).

Le strips sono state in seguito lavate per due volte per 5 minuti con terreno contenente HEPES e fattore tubulare umano (HTF) e successivamente sono state fissate per le analisi morfologiche e ultrastrutturali.

3.3.2 Vitrificazione e scongelamento

Per la vitrificazione del tessuto ovarico è stato usato i kit Medicult Vit rification Cooling (*Origio*)

In una piastra i campioni di tessuto sono stati prima incubati per 30 minuti a temperatura ambiente in 1 mL di Equilibrium Medium contenente 7.5% (v/v) di etilenglicole (EG) , 7.5% (v/v) di 1-2 propandiolo (PROH); poi sono stati trasferiti nel Vitrification Medium (15% (v/v) EG, 15% (v/v) PROH e 0.5M di saccarosio) per 20 minuti.

Dopo questo passaggio i pezzetti di tessuto sono state immediatamente immerse nell'azoto liquido, trasferite in una *cryovial* pre-raffreddata e infine conservate in azoto liquido.

Per lo scongelamento è stato utilizzato il Thawing kit (*Origio*); dopo che le *vials* sono state tenute per 40 secondi all'aria, i pezzetti di tessuto sono stati immersi nel Thawing Medium ,a 37°C, contenente 1M di saccarosio per 1 minuto. Il campione è stato poi trasferito per 3 minuti rispettivamente nel Diluent Medium I e nel Diluent Medium II, contenente 0,5 M e 0.25 M di saccarosio. È stato poi lavato per due volte/3 minuti nel Washing medium e successivamente è stato fissato per le analisi morfologiche e ultrastrutturali.

3.4 Valutazione dell'integrità del tessuto ovarico dopo criopreservazione

3.4.1 Microscopia ottica

3.4.1.1 Preparazione del campione

Con la collaborazione del laboratorio di *Morfologia Umana* e della prof.ssa Marina Zweyer (DSMCS, Università di Trieste), per ogni paziente il tessuto fresco e il tessuto scongelato sono stati fissati in tampone cacodilato 0,1 M con glutaraldeide al 2,5 % (pH

7,2-7,4) per 3 ore a 4°C e un'ora a temperatura ambiente. Sono stati poi lavati 3 volte per 30 minuti a T ambiente in tampone cacodilato 0,1 M. La postfissazione è stata eseguita in tetrossido d'osmio OsO₄ all'1% in tampone cacodilato 0,1M per 2 h a 4°C e successivamente sono stati fatti 3 lavaggi in tampone.

Poi i campioni sono stati disidratati in alcoli etilici a concentrazione crescente (alcool 50%, poi 70%, 90% e infine tre passaggi in alcool assoluto) e in seguito due passaggi da 15 minuti in ossido di propilene. I campioni così trattati sono stati poi inclusi in resina epossidica Durcupan (Fluka, Sigma) per tre giorni a 60°C.

Per ogni campione, una sezione semifina di 0,5 µm ogni cinquanta è stata raccolta [38], è stata poi colorata a caldo (70°C) con blu di toluidina all'1% in Na₂CO₃ allo 0,5% ed è stata osservata usando un microscopio ottico Zeiss AxioPhot equipaggiato di telecamera ProgRes CF coll (Jenoptik).

3.4.1.2 Metodi di valutazione

Ogni sezione è stata osservata con microscopio ottico a 20 ingrandimenti per individuare gli eventuali artefatti ed eliminare i campioni senza tessuto corticale ovarico. Le sezioni sono poi state osservate a 100x per valutare lo stadio di sviluppo dei follicoli secondo la classificazione di Gougeon [84] qualora essi fossero presenti:

Follicoli primordiali: follicoli con l'ovocita circondato da un singolo strato di cellule della granulosa appiattite.

Follicoli intermedi: follicoli con l'ovocita circondato da cellule della granulosa sia appiattite che cuboidali

Follicoli primari: follicoli con l'ovocita circondato da uno strato di cellule della granulosa cuboidali

Follicoli secondari: follicoli con l'ovocita circondato da due o più strati di cellule della granulosa cuboidali

Follicoli atresici: follicoli in cui l'ovocita presenta citoplasma eosinofilo e aggregazione e contrazione della cromatina.

Per evitare di fare una doppia conta, ogni follicolo è stato seguito attraverso le sezioni vicine e contato una sola volta.

Per valutare i danni da crioconservazione i follicoli intermedi e primari sono stati raggruppati in un unico gruppo e sono stati valutati con i criteri usati da Keros [40]. I follicoli sono così stati classificati:

- intatti: assenza di evidenti segni di degenerazione di ovocita e cellule stromali, membrana basale intatta e collegata alle cellule della granulosa
- degenerati: presenza di ovocita intatto ma più del 50% di distacco dell'ovocita dalle cellule della granulosa e/o vacuolizzazione dell'ooplasmia e/o cellule della granulosa degenerate e/o distacco della membrana basale.

3.4.2 Microscopia elettronica a trasmissione

3.4.2.1 Preparazione del campione

I campioni contenenti follicoli sono stati selezionati al microscopio ottico e da essi sono state tagliate sezioni ultrasottili (80 nm di spessore) che sono state deposte su un retino di rame di 3 mm e colorate con acetato di uranile in soluzione acquosa saturata per 15-20 minuti e citrato di piombo per 5 minuti; sono state osservate e fotografate con un microscopio TEM Jeol Jem 100S.

3.4.2.2 Metodi di valutazione

I cambiamenti ultrastrutturali sono stati valutati osservando la struttura di ovociti, cellule della granulosa e cellule stromali a ingrandimenti da 500x a 10.000x. Per avere una quantità rappresentativa di tessuto disponibile per le valutazioni TEM è stato utilizzato il metodo di Fabbri [38]; ogni elemento del tessuto è stato analizzato separatamente in 10 campi microscopici random, chiamati High Power Fields (HPF), per tutte le condizioni di ogni paziente.

Per la valutazione ultrastrutturale sono stati seguiti i criteri di Sheikhi *et al.* [47]: negli ovociti è stata studiata la struttura della cromatina, l'integrità della membrana nucleare, la grandezza e il numero di vescicole nel citoplasma, l'integrità della membrana citoplasmatica e l'attacco dell'ovocita alle cellule della granulosa.

Gli stessi parametri sono stati usati per valutare le cellule della granulosa, determinando anche il legame tra le cellule e la membrana basale.

Se tutte le strutture erano integre gli ovociti e le cellule della granulosa sono stati considerati come intatti, se le cellule presentavano più del 50% di vacuoli, erano

collassate e/o la membrana citoplasmatica e nucleare erano rotte sono stati considerati degenerati.

Per le cellule stromali si è tenuto conto della membrana nucleare e citoplasmatica e della cromatina nucleare; il tessuto senza nessun danno, con cellule stromali integre e nessun cambiamento nella struttura dei fasci di collagene sono state considerate integre. Mentre il tessuto è stato considerato degenerato in presenza di più del 50% di vacuoli e/o vacuolizzazioni estese e cellule stromali con nuclei picnotici o danni alle membrane.

3.4.3 Analisi statistica

I dati categorici sono stati riassunti usando numeri e percentuali, sia per la microscopia ottica che per la microscopia elettronica. Per valutare se il grado di vitalità delle cellule (considerate come intatte o degenerate) è associato con i differenti protocolli di criopreservazione o con il tessuto fresco è stato usato il test esatto di Fischer a due code (GraphPad). È stato considerato statisticamente significativo $P < 0.05$.

3.4.4 Microspettroscopia in fluorescenza da raggi X (XRF)

3.4.4.1 Preparazione del campione

Per queste analisi sono stati usati alcuni campioni, tessuto fresco e tessuto dopo congelamento lento, già precedentemente selezionati con la microscopia elettronica e che mostravano segni di danno caratteristico.

I tessuti osmificati e inclusi in resina epossidica sono stati tagliati 5 μm e posti su una pellicola di ultralene, materiale polimerico a base di carbonio dello spessore di 4 μm , e lasciati asciugare all'aria [54].

3.4.4.2 Set up e analisi dei dati

La microspettroscopia a raggi X è stata effettuata alla linea ID21 del Sincrotrone Europeo (ESRF, Grenoble, Francia) usando il set up già utilizzato da Pascolo *et al.* [85]. L'eliminazione dei fasci armonici non necessari è stata ottenuta con un doppio specchio di silicone rivestito di nichel sul piano orizzontale; mentre per selezionare e analizzare l'energia del fascio è stato usato un monocromatore a due cristalli di Si(111) con uscita fissa (Kohzu, Japan).

Il fascio monocromatico di raggi X, di energia 7.3 keV, è stato focalizzato sul campione usando una 'zone plate' di Fresnel (Zone Plate Ltd, UK). La grandezza dello spot è

solitamente di $0.2 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ e il flusso di fotoni ha una larghezza di banda di 3.5×10^9 fotoni/s/Si(111).

Il campione è stato montato su un supporto x-y-z, inclinato di 30° rispetto all'asse ottico e a 3,5 cm da esso è abbinato ad un rivelatore di fluorescenza (Silicon Drift Detector)(Bruker, Germany) con 80 mm^2 di superficie attiva.

Le immagini sono state acquisite scansionando il campione, con uno *spot size* da 0.25 a $0.5 \mu\text{m}$. Il tempo di acquisizione era di circa 300 ms/pixel. La deconvoluzione delle mappe di fluorescenza degli elementi è stata ottenuta usando il software PyMCA [86].

3.5 Reclutamento dei pazienti e raccolta campioni di liquido seminale

Venti campioni di liquido seminale sono stati ottenuti, previo consenso informato, da pazienti sani afferenti al S.S.D. di Procreazione Medicalmente Assistita del I.R.C.S.S. Burlo Garofolo di Trieste.

Tutti i campioni sono stati raccolti mediante masturbazione dopo 2-7 giorni di astinenza sessuale, processati secondo le linee guida del World Health Organization (WHO, 2010) e sono risultati normozoospermici.

Dieci campioni sono stati usati per le analisi di spettroscopia vibrazionale, mentre gli altri 10 campioni sono stati divisi in due aliquote per l'analisi con arancio di acridina: un'aliquota è stata congelata, l'altra è stata trattata con reagente di Fenton.

3.5.1 Preparazione del campione per analisi FTIR

Il liquido seminale di 10 pazienti, è stato capacitato tramite swim-up, 1mL di campione è stato lavato in 2 mL di terreno (Quinn's Advantage Medium w/HEPES, SAGE BioPharma™, Bedminster, NJ, USA) supplementato con 0.5% di albumina sierica umana (SAGE Assisted Reproduction Products™, CooperSurgical, Trumbull, CT, USA) e centrifugato a 300g per 10 minuti. Il soprnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in 0.5 mL di terreno. Sulla sospensione di spermatozoi sono stati poi stratificati 0.5 mL dello stesso terreno e la provetta, inclinata con un angolo di 45 gradi, è stata incubata a 37°C per 45 minuti.

Successivamente il soprnatante contenente gli spermatozoi capacitati è stato aspirato con una pipetta Pasteur e un'aliquota è stata usata per valutare la concentrazione e la motilità degli spermatozoi.

3.5.2 Induzione dello stress ossidativo

Per indurre il danno ossidativo negli spermatozoi è stata usata la reazione di Fenton così come descritto nel lavoro di Sanchez [76] usando due diversi reagenti di Fenton composti da H₂O₂ 3% e un egual volume di 50 mM FeSO₄ o 50 mM FeCl₂.

I campioni, dopo essere stati trattati con quantità crescenti di Fenton-FeSO₄ (10%, 20%, 30%) e Fenton-FeCl₂ (10%, 20%), sono stati mantenuti in ghiaccio per 30 minuti; la reazione è stata poi bloccata lavando due volte con NaCl 0.9% (300g per 6 minuti,

4°C). Il soprannatante è stato eliminato ed il pellet è stato fissato per 20 minuti a temperatura ambiente con 50µL di paraformaldeide 4% in PBS.

Infine prima di procedere con le analisi spettroscopiche i campioni sono stati lavati due volte con NaCl 0.9% (300g per 6 minuti, 4°C) per bloccare la fissazione.

Tutte le condizioni sono state ripetute almeno per tre pazienti.

3.5.3 Spettroscopia FTIR e analisi dei dati

Gli spettri di trasmissione FTIR sono stati acquisiti alla beamline SISSI di Elettra – Sincrotrone Trieste (Italia) con un microscopio Hyperion 3000 Vis-IR con detector HgCdTe (100 µm), accoppiato con un interferometro Vertex 70 (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany).

Prima dell'analisi gli spermatozoi sono stati risospesi con soluzione fisiologica e depositati in gocce su un dispositivo fluidico di CaF₂, come descritto in altri lavori.

Piccoli gruppi di spermatozoi, circa 20-40 cellule, sono stati selezionati e poi misurati impostando: apertura a 25 x 25 µm, condensatore 15x, obiettivo Schwarzschild (NA= 0,4), calcolando una media di 512 scansioni con una risoluzione spettrale di 4 cm⁻¹ nella range spettrale da 800 a 4000 cm⁻¹, con una velocità di scansione di 40kHz.

Gli spettri sono stati corretti per il biossido di carbonio e i vapori di acqua usando la compensazione atmosferica con il programma OPUS 7.0 (Bruker Optics GmbH) [87].

Al fine comparativo, ogni spettro sottratto è stato sottoposto a procedura di normalizzazione vettoriale nella regione dello spettro a 3050-920 cm⁻¹, ed infine sono stati raggruppati ed è stata fatta la media. È stata calcolata anche la deviazione standard dello spettro delle medie.

La derivata seconda degli spettri sottratti è stata calcolata per la media degli spettri usando OPUS 7.0 (Bruker Optics GmbH) nella regione spettrale 3020-920 cm⁻¹ (Savitzky-Golay filter, 17 smoothing points).

3.5.4 Microscopia a raggi X e µXRF e analisi dei dati

Per le analisi XRF, un'aliquota di 2 µL della sospensione di spermatozoi fissati è stata fatta asciugare su una membrana di Si₃N₄ (spessore 10 µm).

Le analisi sono state effettuate alla linea TwinMic, di Elettra – Sincrotrone Trieste, Italia [52, 88].

Il microscopio TwinMic è stato usato nella modalità di scansione a trasmissione (STXM) con il fascio focalizzato sul campione tramite un'ottica di diffrazione 'zone plate' che permette di avere una risoluzione spaziale sub micrometrica.

Per questi esperimenti è stata usata un'energia di 1.4 KeV per eccitare il campione e ottenere delle condizioni ottimali di emissione per gli elementi di maggior interesse (magnesio, ferro e ossigeno). Il campione è stato analizzato con uno *spot size* di 500 nm e un tempo di rilevazione di 5 secondi per pixel.

Il campione è stato scansionato con un raggio perpendicolare alla sua superficie. I fotoni XRF emessi dal campione sono stati raccolti da otto detector SSD (Silicon Drift) posizionati a 2 cm dal campione [89]. La distribuzione degli elementi è stata calcolata elaborando gli spettri XRF e facendo la deconvoluzione con un software PyMCA [86].

3.5.5 Procedura di congelamento/scongelo del liquido seminale

I campioni di 10 pazienti sono stati congelati con un terreno commerciale: lo Sperm Freezing Medium (ORIGIO, Denmark) che è composto principalmente da glicerolo, saccarosio e albumina sierica umana; sono state seguite le istruzioni del fornitore.

Brevemente, il liquido seminale dei 10 pazienti, è stato diluito 1:1 (v/v) con il terreno di congelamento precedentemente portato a temperatura ambiente; il terreno è stato aggiunto goccia a goccia e dopo ogni aggiunta il campione è stato mescolato per inversione.

Il campione è stato poi inserito, tramite una siringa, in *paillettes* da 300 µL che sono state sigillate con una termosaldatrice; le *paillettes* sono state lasciate ad equilibrare per 10 minuti a temperatura ambiente.

Infine si è proceduto al congelamento rapido dei campioni, che sono stati prima posti nei vapori di azoto per 10 minuti ed infine immersi nell'azoto liquido (-196 C°) dove sono stati conservati.

Dopo una settimana i campioni sono stati scongelati: le *paillettes*, dall'azoto liquido sono state poste a temperatura ambiente per 5 minuti e successivamente l'estremità sono state tagliate per recuperare il campione.

Il campione scongelato è stato lavato, per due volte, con 2 mL di terreno ((Quinn's Advantage Medium w/HEPES, SAGE BioPharma™, Bedminster, NJ, USA) supplementato

con 0.5% di albumina sierica umana (SAGE Assisted Reproduction Products™, CooperSurgical, Trumbull, CT, USA)) e centrifugato a 300g per 10 minuti.

Infine il soprannatante è stato eliminato, il pellet risospeso in 0.1 mL di terreno e un'aliquota è stata misurata per valutare la concentrazione e la vitalità degli spermatozoi.

3.5.6 Colorazione con arancio di acridina e valutazione

Per la colorazione con arancio di acridina (AO) è stato seguito il protocollo proposto da Tejada nel 1984 [90].

Brevemente, per ogni campione, è stato preparato uno striscio su un vetrino pre-pulito con 10 µL di liquido seminale scongelato che è poi stato lasciato asciugare all'aria per circa 20 minuti.

I vetrini sono stati poi fissati con la soluzione di Carnoy's (3 parti metanolo/1 parte acido acetico glaciale) per tutta la notte.

Dopo la fissazione, i vetrini sono stati lasciati asciugare all'aria per alcuni minuti e sono stati colorati come segue: la soluzione di colorazione è stata preparata con 1 gr di AO in 1000 mL di acqua distillata; 10 mL di questa soluzione sono stati aggiunti a 40 mL di acido citrico 0.1 M e 2.5 mL di Na₂HPO₄*7H₂O 0.3 M. Il pH finale della soluzione era pH=2.5.

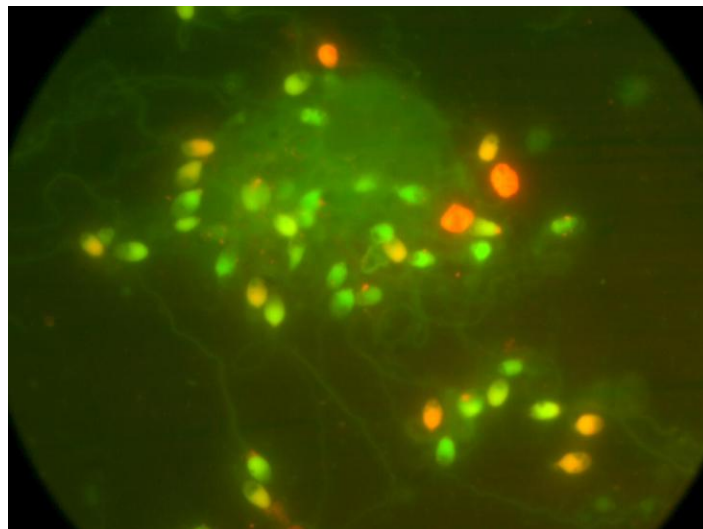


Figura 6: Microscopia a fluorescenza degli spermatozoi colorati con arancio di acridina; le cellule verdi hanno il DNA integro, mentre le cellule con fluorescenza dal giallo/arancione al rosso hanno il DNA danneggiato.

Ogni vetrino è stato colorato con alcune gocce di soluzione di AO, per 5 minuti al buio, successivamente sono stati lavati con acqua deionizzata e coperti con un vetrino copri-oggetto. I campioni sono stati immediatamente valutati al microscopio confocale a fluorescenza (Zeiss-Axiophot) usando un filtro 450-490 nm.

Sono stati contati 500 spermatozoi per ogni vetrino soffermandosi al massimo 40 secondi per ogni campo; è stato usato un obiettivo 100x immerso in olio.

È stata calcolata la percentuale di spermatozoi con fluorescenza verde, che sono integri, e la percentuale degli spermatozoi con fluorescenza che andava dal giallo-arancione al rosso che sono quelli danneggiati (Figura 6).

Per ogni campione è stato calcolato l'indice di frammentazione del DNA (DFI) [91], che è il rapporto fra il totale di cellule giallo/rosse e la somma totale delle cellule (verdi+giallo/rosse).

I dati raccolti sono presentati come media e deviazione standard.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Comparazione dei protocolli per la criopreservazione del tessuto ovarico: congelamento lento e vitrificazione

Tutti i sistemi di criopreservazione, per il tessuto ovarico, che sono stati proposti in letteratura fin ad oggi, causano una perdita del pool di follicoli e di cellule stromali rispetto al tessuto ovarico fresco. I lavori che comparano congelamento lento e vitrificazione non sono molti e conducono a conclusioni diverse; molto probabilmente questo deriva dalla differenza tra i metodi utilizzati e le diverse variabili studiate [92].

L'integrità del tessuto dopo il congelamento dipende dalle condizioni iniziali (a fresco) dello stesso [40]; nel nostro studio abbiamo comparato due diversi protocolli di criopreservazione su tessuti ottenuti dalla stessa paziente, processando in parallelo per ogni protocollo il tessuto donato.

In questa maniera abbiamo potuto di minimizzare l'effetto della variazione tra diverse pazienti, infatti è noto che comparando donne differenti c'è un'ampia differenza fra il numero e la distribuzione dei follicoli [93].

In questo studio sono stati utilizzati due protocolli commerciali normalmente usati per il congelamento di embrioni che sono utilizzati normalmente nei nostri laboratori di Procreazione Medicalmente Assistita; abbiamo deciso di usare questi terreni poiché i crioprotettori presenti e la loro concentrazione sono simili a quelli usati da altri gruppi che con essi hanno ottenuto buoni risultati [38, 48, 94]. È importante ricordare che tutti i protocolli presenti in letteratura per congelare il tessuto ovarico derivano da protocolli usati nella pratica clinica per ovociti ed embrioni, ai quali sono stati apportati alcuni cambiamenti [95, 96]; anche noi, infatti, rispetto al protocollo commerciale abbiamo aumentato i tempi di incubazione delle strip nel terreno per permettere una completa permeazione nell'intero tessuto [46].

Il terreno che è stato utilizzato per il congelamento lento contiene propandiole (PROH), saccarosio e 20% di sostituto del siero sintetico (SSS); in vari lavori è risultato che questa combinazione di crioprotettori permettono di ottenere risultati soddisfacenti nella preservazione delle cellule follicolari mentre le cellule stromali in

alcuni casi appaiono alterate [32, 38, 45]. Il nostro terreno inoltre è composto da un tampone che contiene colina; Talevi *et al.* [48] nel loro lavoro hanno dimostrato che l'uso del PROH come crioprotettore in un mezzo sostituito con colina rappresenta un buon terreno per la criopreservazione col congelamento lento. Rispetto ai terreni contenenti tamponi con sodio si ottiene una migliore preservazione degli ovociti, delle cellule follicolari e dello stroma e una bassa percentuale di danni ai mitocondri a livello ultrastrutturale.

Infatti, uno dei principali danni da congelamento, è causato da un eccessivo incremento dei soluti extracellulari, soprattutto degli ioni sodio, perché il loro eccesso non viene smaltito da pompe specifiche che smettono progressivamente di funzionare quando diminuisce la temperatura [48].

La colina invece non attraversa le membrane e sembra avere anzi una funzione protettiva legandosi ai fosfolipidi delle membrane stesse [97]. È stato inoltre dimostrato che sostituendo il sodio con la colina, nel mezzo base nel quale sono disciolti i crioprotettori, follicoli e cellule stromali mantengono una morfologia migliore dopo scongelamento [36, 48].

Per il protocollo di vitrificazione, invece, ci siamo basati sia sulla procedura descritta da Zhang *et al.* [94] che ha ottenuto una buona conservazione delle cellule di tessuto ovarico nel topo usando 20% di etilenglicole (EG) e 20% propandiolo (PROH); sia sul protocollo descritto da Fabbri *et al.* [46] che, su tessuto ovarico umano, usa una combinazione di EG, PROH e saccarosio in due fasi: una di equilibrizzazione e una di vitrificazione; equilibrando il tessuto per 30 minuti ottiene una corretta disidratazione dello stesso con una buona preservazione sia delle cellule follicolari che delle cellule stromali.

Nel tessuto che abbiamo avuto a disposizione per questo studio, la frazione di follicoli primordiali è molto bassa, mentre i primari e intermedi rappresentano la maggior parte della popolazione di follicoli (Figura 7); inoltre sono stati trovati solo tre follicoli secondari e due atresici.

I nostri dati sono in accordo con precedenti lavori che dimostrano che, in relazione all'età, la porzione di follicoli primordiali diminuisce mentre aumenta quella dei follicoli primari [40]; infatti la media dell'età delle nostre pazienti è di 37,8 anni. Inoltre nei

campioni di tre pazienti non è stato trovato alcun follicolo, quindi sono state valutate soltanto le cellule stromali.

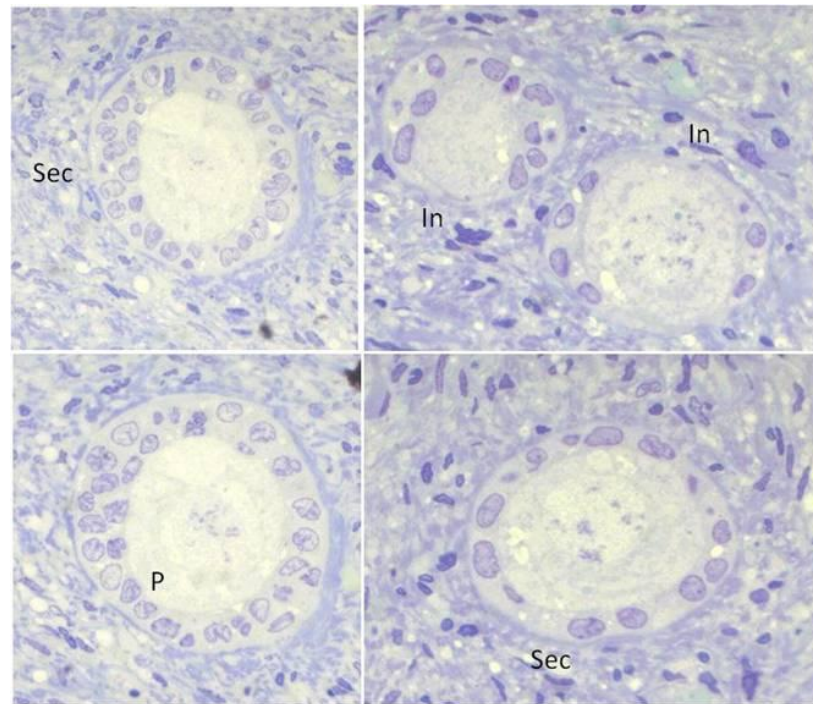


Figura 7: Immagine rappresentativa della corticale ovarica umana. Un pezzo di tessuto fresco di controllo che contiene follicoli intermedi (In), primari (P) e secondari (Sec).

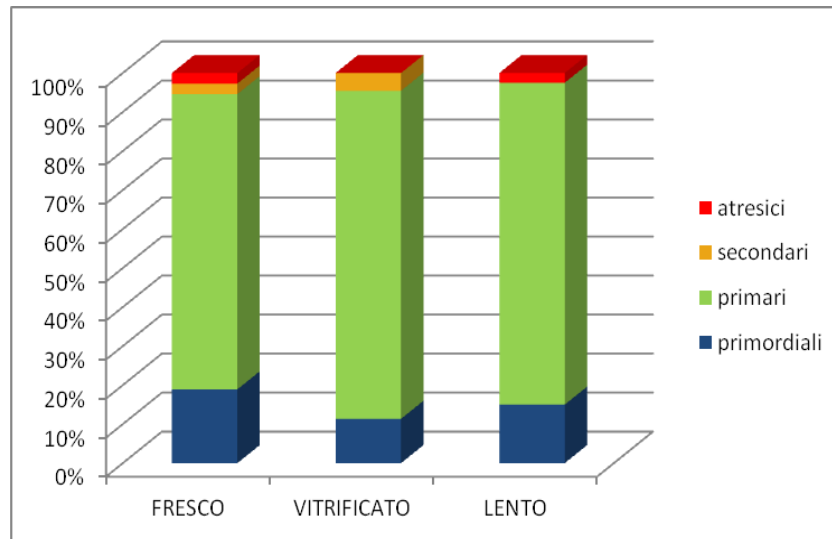
Una relazione significativa fra l'età e la densità follicolare, così come un'ampia variazione nel numero e nella distribuzione dei follicoli in pazienti diverse, anche tra diversi frammenti dello stesso ovaio, è stata dimostrata anche da Schmidt [93].

4.1.1 Microscopia ottica

Sono stati valutati, con un microscopio ottico, un totale di 121 follicoli, con una media di 20 follicoli per paziente; il numero di follicoli osservati è equamente distribuito tra i differenti protocolli (Figura 8a): controllo (31%), congelamento lento (33%) e vitrificazione (36%).

Dei follicoli trovati, 18 (14%) erano primordiali, 98 (81%) erano intermedi/primari e sono stati raggruppati in un unico gruppo, 3 (3%) erano secondari e solo 2 (2%) erano atresici .

Come si può osservare nella Figura 8 esistono delle differenze nella distribuzione all'interno dei protocolli e tra i diversi protocolli, come già in precedenza descritto anche da altri gruppi [38], ma la differenza non è significativa e dipende dall'età delle pazienti, dalle diverse patologie e dalla non omogenea distribuzione dei follicoli, che normalmente nelle pazienti adulte sono distribuiti in cluster.



(a)

(b)

	Totale	Primordiali		Primari/intermedi		Secondari		Atresici	
		Tot	Intatte	Tot	Intatte	Tot	Intatte	Tot	Intatte
Controllo	37	7	7 (100%)	28	27 (96,4%)	1	1 (100%)	1	1 (100%)
C. lento	44	5	5 (100%)	37	32 (86%)	2	1 (50%)	0	0
Vitrificato	40	6	5 (83,3%)	33	27 (81,8%)	0	0	1	0 (0%)

Figura 8: (a) Proporzioe dei follicoli primordiali, primari/intermedi, secondari e atresici nel tessuto ovarico umano valutato: fresco, congelamento lento, vitrificato. (b) numeri e proporzioni (%) dei follicoli primordiali, primari/intermedi, secondari e atresici valutati nel tessuto ovarico umano fresco, congelato con congelamento lento e vitrificato.

Nei campioni di controllo i follicoli primordiali, intermedi e primari mostrano una morfologia normale (Figura 9); le cellule follicolari sono di forma regolare e presentano una stretta aderenza con l'ovocita. Il nucleo degli ovociti è il più delle volte eucromatinico con contorno lineare e il citoplasma può presentare numerosi mitocondri attorno al nucleo a seconda del livello a cui è stata eseguita la sezione, inoltre possono essere presenti rare vescicole (Figura 9A).

Sono stati poi esaminati follicoli secondari con cellule della granulosa di forma regolare. Le cellule in proliferazione talvolta esibiscono un nucleo dal contorno non del tutto lineare. Gli ovociti osservati sono normo-conformati.

Da un'osservazione globale al microscopio ottico non si rivela nessuna chiara differenza nella struttura dei follicoli criopreservati usando i due diversi protocolli (Figura 9C, E), tranne la saltuaria presenza di vacuoli, anche di medie dimensioni, all'interno del citoplasma degli ovociti criopreservati con il congelamento lento.

L'analisi comparativa (Figura 8) mostra che la proporzione dei follicoli morfologicamente intatti è ridotta sia dopo vitrificazione (86%) che dopo congelamento lento (80%) rispetto al tessuto di controllo (97%). Risulta però che in confronto con il tessuto fresco, il danno ai follicoli nei campioni trattati col il congelamento lento è statisticamente significativo ($p=0.02$), mentre il danno dopo vitrificazione non è significativo.

Con l'uso di entrambi i protocolli si può notare inoltre una maggior perdita di follicoli intermedi/primari rispetto ai follicoli primordiali, questi ultimi infatti sono meno sensibili alla procedure di congelamento rispetto ai follicoli in crescita [98].

Per quanto riguarda il tessuto connettivo, tutti i protocolli utilizzati causano un certo danno, infatti, la preservazione delle cellule stromali è peggiore rispetto al tessuto fresco.

Nei campioni di controllo i fibroblasti presentano forma ovale o fusata; i nuclei contengono cromatina dispersa e condensata e il citoplasma esibisce piccole e regolari vescicole. Non c'è edema nella matrice extracellulare (Figura 9B).

Nei campioni trattati con il congelamento lento, si nota complessivamente una diminuzione del numero delle cellule e una notevole presenza di ampi vacuoli (Figura 9D).

Nella vitrificazione osserviamo uno stroma più compatto con una minore perdita di cellule e una presenza meno cospicua di vacuoli che sono anche di dimensioni più piccole rispetto ai campioni sopra citati (Figura 9F).

Agli ingrandimenti della microscopia ottica è non però possibile stabilire se essi siano intra o extra-cellulari. Considerando quindi entrambe le componenti del tessuto ovarico, follicoli e stroma, la vitrificazione fornisce migliori risultati di preservazione che risultano abbastanza simili a quelli del tessuto fresco.

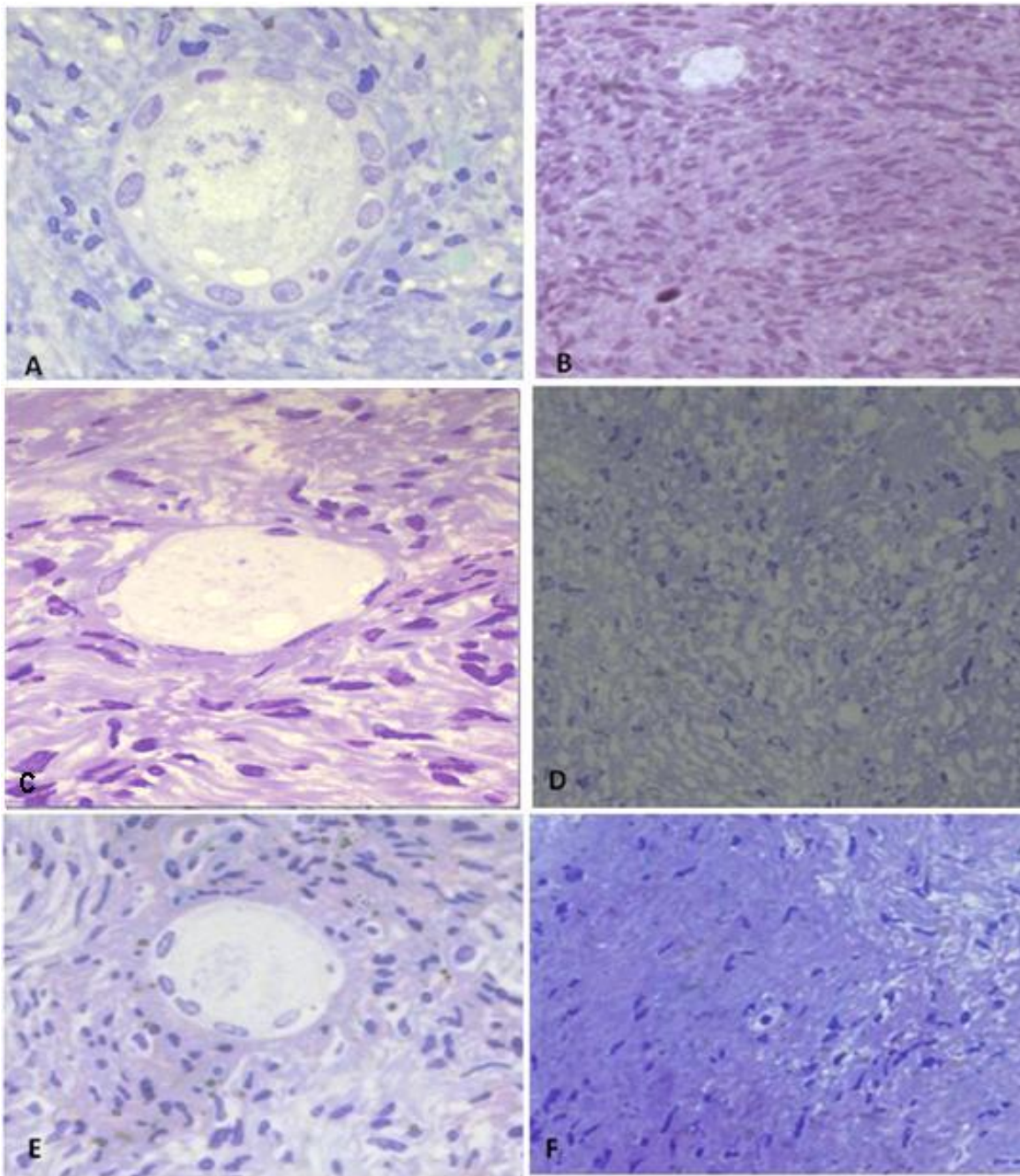


Figura 9: Immagini al microscopio ottico del tessuto ovarico fresco (A,B), criopreservato con congelamento lento (C,D) e vitrificato (E,F). Follicoli intermedi (A,E) sono ben preservati presentano l'ovocita e le cellule follicolari intatte, nuclei ben conformati e citoplasmi omogenei. Follicolo primordiale (C) si notano dei vacuoli all'interno della cellula follicolare dopo congelamento lento. Lo stroma si presenta compatto e normo-conformato nel tessuto fresco (B), alterato con evidenti vacuoli dopo il protocollo di congelamento lento (D), si possono notare ampi spazi vuoti e una diminuzione del numero di cellule. Il tessuto connettivo vitrificato appare solo leggermente alterato (F).

4.1.2 Microscopia elettronica a trasmissione

Per un'osservazione ad alto ingrandimento e ad alta risoluzione è stata utilizzata la microscopia elettronica a trasmissione sui medesimi campioni (Tabella 3); sono stati valutati 36 follicoli, 33 ovociti (12 campione controllo, 11 vitrificato e 10 lento) e 294 cellule della granulosa. Per tre follicoli le sezioni ultrasottili sono state tagliate a ridosso della superficie e non è stato possibile valutare l'ovocita, sono però state valutate le cellule della granulosa.

L'integrità del tessuto connettivo è stata valutata in 10 campi, scelti in maniera casuale, ad alto ingrandimento (High Power Fields) per ogni protocollo [46]; sono state analizzate un totale di 3496 cellule stromali.

In linea generale l'ultrastruttura dei follicoli si preserva abbastanza bene sia nei tessuti vitrificati sia congelati lentamente, mentre lo stroma subisce delle importanti modificazioni.

La morfologia dell'ovocita, l'integrità delle cellule della granulosa e dello stroma ovarico sono stati analizzati nel dettaglio.

	Numero di ovociti (%)		Numero di cellule della granulosa (%)		Numero di cellule stromali (%)	
	Totali	Intatti	Totali	Intatti	Totali	Intatti
Controllo	12	12 (100%)	108	106 (98%)	1298	1246 (96%)
C. Lento	10	7 (70%)	87	66 (76%)	1134	493 (38%)
Vitrificazione	11	9 (81%)	99	81 (82%)	1064	748 (66%)

Tabella 3: risultati della valutazione ultrastrutturale: (effettuata mediante microscopio TEM) degli ovociti, cellule della granulosa e cellule stromali nel tessuto ovarico fresco, congelato con congelamento lento e vitrificato. I dati sono presentati come numero totale e percentuali.

Ultrastruttura dell'ovocita

I campioni di controllo presentano ampi ovociti con nuclei di forma regolare, cromatina finemente dispersa oppure sotto forma di aggregati di piccole dimensioni, i nucleoli sono spesso visibili. L'involucro nucleare presenta le due membrane regolari e i pori nucleari. Il citoplasma è omogeneo, i mitocondri hanno una forma

rotondeggiante o ovale ed è presente il reticolo endoplasmatico granulare (Figura 10A, B).

L'ultrastruttura degli ovociti, agli ingrandimenti più bassi del TEM, non varia tra i due protocolli e risulta simile a quella del tessuto non congelato (Figura 10C, E, G). A più alti ingrandimenti nel tessuto criopreservato con il congelamento lento, si nota però un aumento della vacuolizzazione nel citoplasma dell'ovocita, che è uno dei principali danni da congelamento (Figura 10D).

La zona di contatto tra l'ovocita e le cellule della granulosa è piuttosto ben preservata e sono visibili anche i dispositivi di giunzione intercellulari (Figura 10E).

La differenza nell'integrità degli ovociti, fra i due protocolli e il tessuto di controllo, non è risultata statisticamente significativa (Tabella 3).

Questi risultati sono in accordo con altri studi presenti letteratura [32, 40, 99]

Ultrastruttura delle cellule della granulosa

Le cellule follicolari nel tessuto fresco sono di forma regolare. Nei follicoli primordiali i nuclei sono di forma allungata mentre negli intermedi, primari e secondari assumono una forma globosa. In tutti i casi è presente sia l'eucromatina, prevalentemente in zona centrale, sia zolle di eterocromatina soprattutto nell'area periferica a contatto con l'involucro nucleare (Figura 10A).

Il citoplasma è intatto e quando gli organelli sono visibili hanno una morfologia regolare; si possono osservare i dispositivi di giunzione tra le cellule della granulosa e l'ovocita; la membrana basale è normoconformata.

L'ultrastruttura delle cellule della granulosa nel congelamento lento esibisce alcuni segni di danno (Figura 10C, D); ad ingrandimento maggiore i nuclei a volte presentano un'indentatura (Figura 10C) ma l'architettura della cromatina sembra non risentirne. Spesso sono presenti vescicole citoplasmatiche (Figura 10C, D).

Nella vitrificazione il quadro morfologico delle cellule follicolari è simile, anche per la stessa presenza dei vacuoli citoplasmatici intracellulari (Figura 10G). In entrambi i casi, le membrane basali appaiono ben conservate.

Dal confronto fra i protocolli (Tabella 3) l'integrità delle cellule della granulosa è significativamente più bassa sia dopo il congelamento lento ($p < 0.001$) che dopo vitrificazione ($p < 0.001$) a confronto con il tessuto non trattato. Tra i due protocolli invece non c'è differenza significativa.

Già altri lavori descrivono che la preservazione delle cellule della granulosa è più variabile di quella degli ovociti in quanto la struttura di queste cellule può variare all'interno di una stessa cellula e tra le diverse cellule all'interno di un follicolo [40].

Ultrastruttura dello stroma

Modificazioni importanti sono state osservate ad alto ingrandimento nel tessuto stromale. Lo stroma è meglio preservato nei campioni vitrificati che in quelli con congelamento lento.

Lo stroma dei controlli è rappresentato da fibroblasti di forma generalmente fusata con nuclei allungati, zolle di eterocromatina diffuse uniformemente oppure concentrate perifericamente. Le fibre collagene formano fasci fusiformi orientati nelle tre direzioni dello spazio e le fibrille collagene esibiscono la tipica bandatura trasversale (Figura 10A) .

Lo stroma dopo il congelamento lento mostra evidenti segni di criodanneggiamento, soprattutto per la presenza di quelle ampie vacuolizzazioni che si erano già riscontrate al microscopio ottico. In questo contesto possiamo dire che la maggior parte di esse è presente all'interno del citoplasma dei fibroblasti e si formano per lo più nella zona adiacente al nucleo, formando ampie insenature a livello dell'involucro nucleare (Figura 10F).

I nuclei presentano una condensazione della cromatina piuttosto spinta a testimoniare importanti alterazioni della sua architettura (nuclei picnotici a vari livelli di danneggiamento). Non sono stati notati danni particolari alle membrane cellulari dei fibroblasti (Figura 10C, F).

I fasci di fibre collagene invece non sembrano particolarmente degradati, anche se la matrice extracellulare amorfa presenta zone chiare e zone particolarmente condensate a testimoniare una certa disomogeneità nella loro composizione (Figura 10D).

Nei campioni vitrificati si osservano nei fibroblasti dei nuclei picnotici a vario livello di danneggiamento e un minor numero di vacuoli intracellulari che sono mediamente di più piccole dimensioni rispetto ai campioni con congelamento lento (Figura 10H). I fasci di fibre collagene nei campioni vitrificati sono uniformi e intatti (Figura 10H) come nei campioni di controllo (Figura 10A).

Lo stroma dei tessuti sottoposti a congelamento lento risulta avere un danno altamente significativo rispetto ai tessuti non congelati ($p < 0.001$). Inoltre la vitalità

dello stroma nel tessuto vitrificato è significativamente migliore rispetto a quello del congelamento lento ($p < 0.001$), tuttavia risulta peggiore quando comparato con il tessuto di controllo ($p < 0.001$).

Concludendo i nostri risultati dimostrano che, a livello morfologico e ultrastrutturale, i protocolli che abbiamo usato mantengono un'ottima preservazione dell'ocita mentre vanno ad alterare in maniera lieve le cellule della granulosa mentre le cellule dello stroma risultano notevolmente influenzate; questi dati sono in accordo con la letteratura [18, 32, 38].

La vitrificazione risulta essere la metodica migliore perché globalmente permette di conservare meglio le varie strutture cellulari rispetto alla criopreservazione con congelamento lento. Ciò non sorprende poiché durante il congelamento lento si dà il tempo alle molecole d'acqua di solidificare formando cristalli di ghiaccio che provocano lesioni alle cellule con conseguenti danni alla loro organizzazione e alla loro funzionalità. Al contrario durante la vitrificazione l'acqua viene portata immediatamente ad uno stato amorfo solidificato, con una limitatissima formazione di cristalli di ghiaccio [100].

Keros [40], che esegue il primo confronto sulla vitrificazione e sul congelamento lento del tessuto ovarico, rileva danni molto gravi a carico dello stroma e della matrice extracellulare dopo congelamento lento.

Nella nostra esperienza, invece, ritroviamo danni molto simili a livello delle cellule stromali, con cospicua vacuolizzazione del tessuto connettivo, ma non troviamo una quantità così evidente di materiale extracellulare in degenerazione. Questo probabilmente è dovuto al fatto che nel nostro protocollo è utilizzata la colina in sostituzione del sodio, e ciò permette una miglior conservazione delle fibre collagene e altri elementi della componente connettivale amorfa che vengono sintetizzati dalle cellule stromali [48].

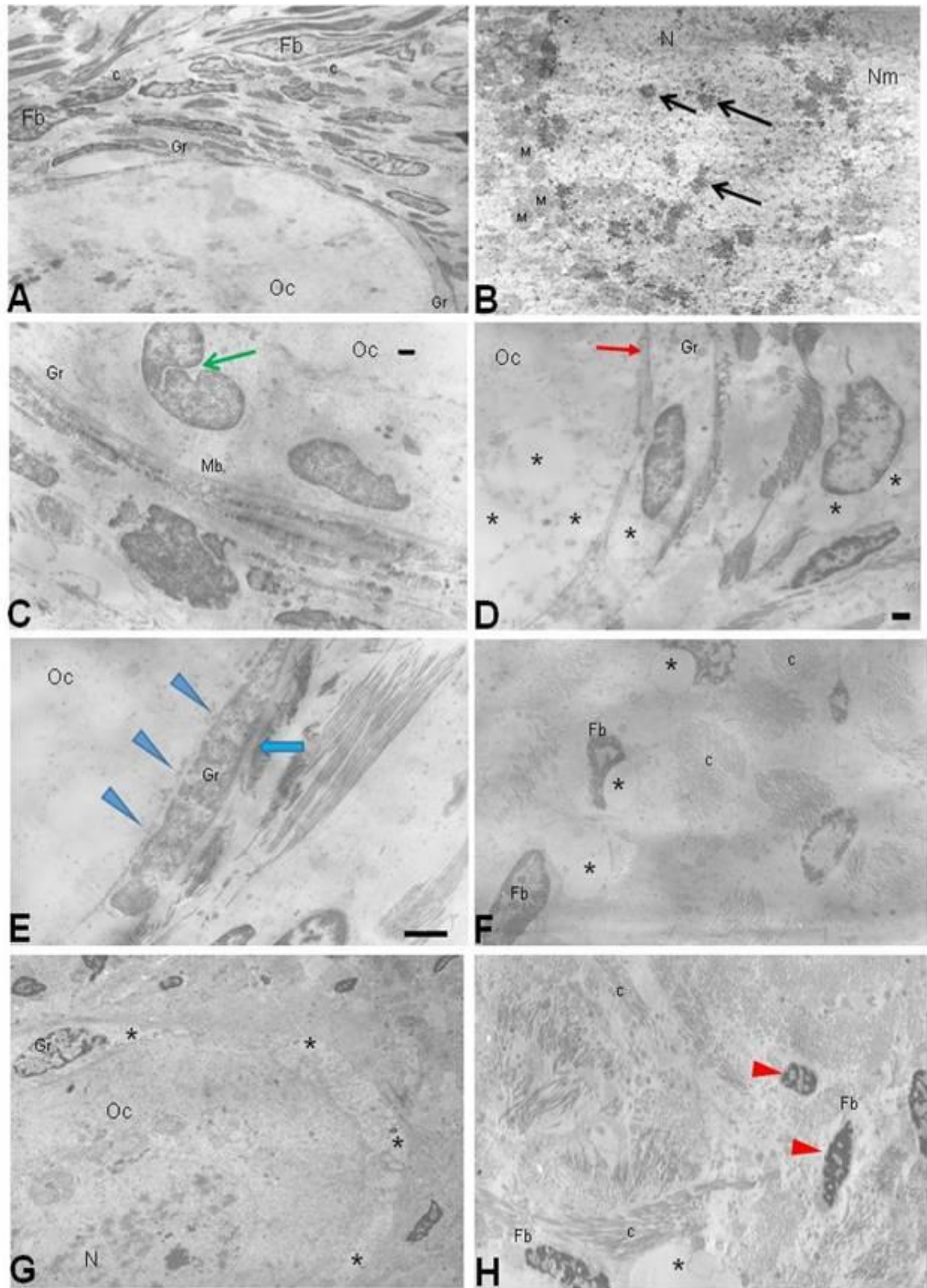


Figura 10: Immagini di follicoli e stroma ovarico al microscopio elettronico di tessuto fresco di controllo (A,B), criopreservato con congelamento lento (C,D,E,F) e vitrificazione (G,H).

Follicolo primordiale nel tessuto di controllo (A,B). L'ovocita (Oc) è circondato da un unico strato di cellule della granulosa appiattite (Gr). A ingrandimento più alto si nota il nucleo dell'ovocita (N) circondato dall'involucro nucleare (Nm), all'intero cromatina granulare condensata (freccia nera). Il citoplasma è organizzato e contiene mitocondri (M) ben definiti.

(C) Follicolo primario ben preservato dopo congelamento lento; i nuclei delle cellule follicolari presentano un'indentatura (freccia verde) e l'architettura della cromatina è normale, membrana basale (Mb) ben conservata; (D) un follicolo primordiale dopo congelamento lento presenta microvillostia (freccia rossa) tra ovocita e una cellula della granulosa, si notano alcuni vacuoli (*) nella cellula follicolare, nel citoplasma dell'ovocita e all'interno di un fibroblasto. A più alto ingrandimento (E) si osservano delle gap junctions (punte di freccia azzurra) tra l'ovocita e le cellule della granulosa. La membrana basale è intatta (freccia azzurra).

Lo stroma è morfologicamente normale nel tessuto fresco (A) è rappresentato da fibroblasti fusati (Fb) e fibre collagene (C) ben organizzate. Dopo scongelamento lento (F) ci sono ampi vacuoli (*) all'interno dei fibroblasti, le fibre collagene sono bene conservate. Follicolo primordiale vitrificato (G) appare normale, salvo la presenza di alcuni vacuoli (*) nelle cellule follicolari; (H) nello stroma si osservano fibroblasti con nuclei picnotici (punte di freccia rossa) ma un minor numero di vacuoli (*).

4.1.3 Analisi XRF per comprendere i cambiamenti biochimici nei tessuti ovarici danneggiati

Lo studio del tessuto ovarico criopreservato confrontato con il tessuto fresco con la tecnica XRF ad ID21 ha permesso di ottenere informazioni sui cambiamenti biochimici che avvengono all'interno del tessuto dopo il processo di congelamento/scongelamento. L'energia usata per eccitare il campione (7.3 keV) permette di ottenere informazioni sulla composizione chimica delle aree analizzate, in particolare per quanto riguarda elementi come il ferro, il fosforo, il calcio e lo zolfo.

I campioni di tessuto ovarico valutati presso ESRF erano già stati precedentemente analizzati con la microscopia ottica ed elettronica a trasmissione, in maniera da poter fare un confronto. I campioni comprendevano dei tessuti di controllo freschi e tessuti congelati con il metodo del congelamento lento.

Per questo tipo di misurazioni il campione è stato preparato depositando una sezione non colorata di tessuto incluso in resina epossidica e trattato con osmio su un foglio di ultralene di 4 μm : un polimero adatto alle analisi a raggi X; vista la mancanza di colorazione si è proceduto alla difficile ricognizione delle porzioni di tessuto contenente follicoli mediante l'aiuto di un microscopio ottico con obiettivo differenziale (DIC).

Le prime analisi sono state eseguite sul tessuto ovarico fresco, e sono rappresentate nella Figura 11.

Le prime tre mappe di fluorescenza riportano la distribuzione di calcio, ferro e fosforo mentre quelle sottostanti, la distribuzione di zolfo e osmio; i primi quattro sono elementi endogeni che descrivono lo stato fisiologico delle cellule, mentre l'osmio deriva dal trattamento dei campioni per il TEM.

Il calcio è distribuito nel nucleo di tutte le cellule presenti: ovocita, cellule della granulosa e cellule stromali; il ferro è localizzato soprattutto a livello delle cellule della granulosa che sono quelle metabolicamente più attive perché oltre alla loro funzione steroidogenica servono a produrre i nutrienti per la maturazione dell'ovocita [101].

Il fosforo è presente in maniera specifica nelle membrane delle cellule presenti nel tessuto, probabilmente sottoforma di fosfolipidi, ed evidenzia in maniera particolare le cellule follicolari.

È interessante la distribuzione dello zolfo che risulta omogenea in tutto il tessuto connettivo; questo segnale deriva principalmente dai glicosamminoglicani (GAG) e proteoglicani che compongono la matrice extracellulare dei tessuti connettivi.

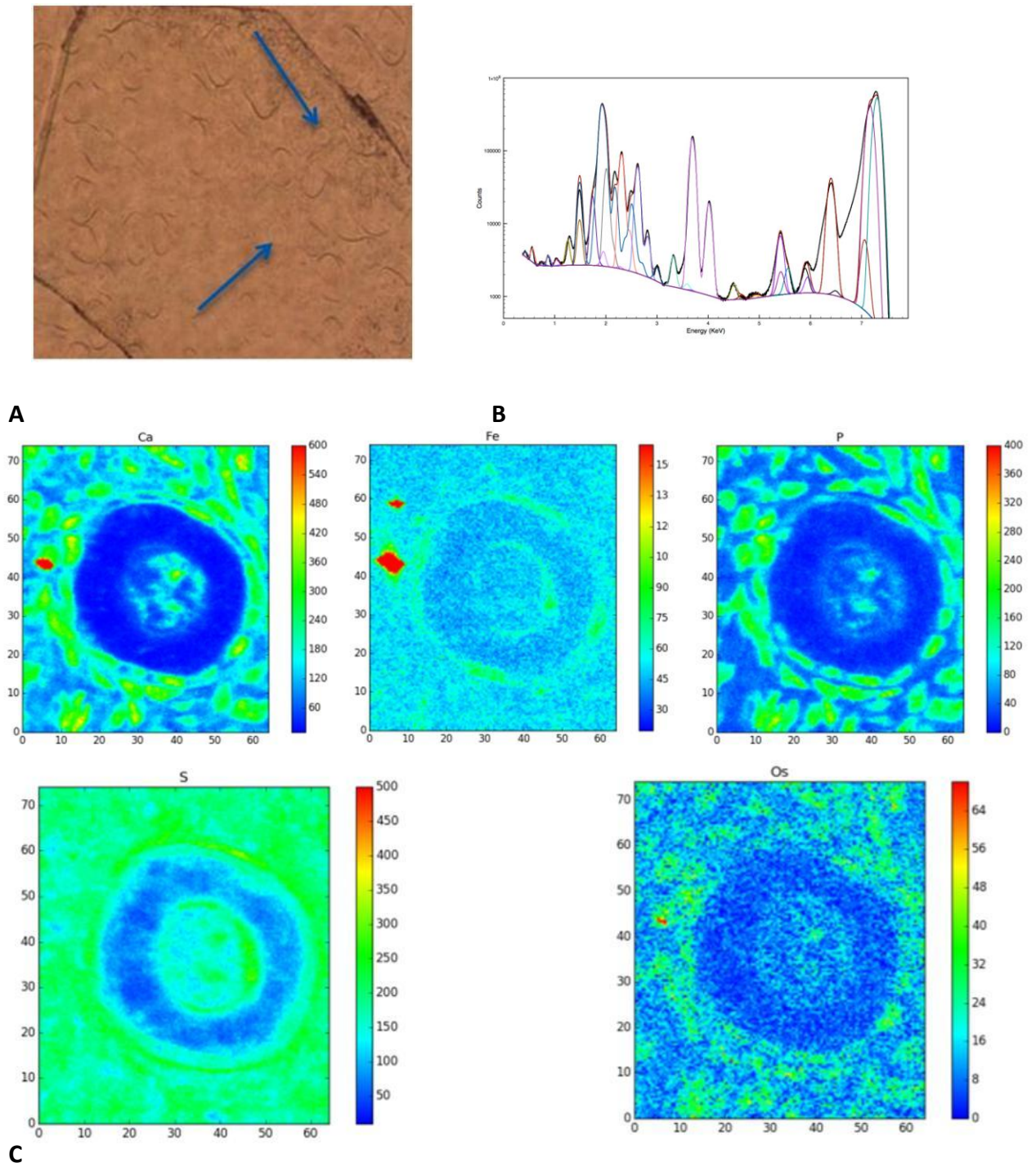


Figura 11: Spettromicroscopia XRF di sezioni di tessuto ovarico fresco: Immagine al microscopio ottico della sezione di tessuto (a), spettro (b) e relative mappe XRF di calcio (Ca), ferro (Fe), fosforo (P), zolfo (S) e osmio (Os) mostrano la distribuzione dei vari elementi nel tessuto ovarico fresco. Le mappe XRF sono state acquisite a 7.3 keV. Le *scale bars* misurano intensità del segnale di fluorescenza in unità arbitrarie che per i diversi elementi non sono paragonabili tra loro.

I GAG sono lunghe catene di disaccaridi a cui sono legati radicali solforici (dermatan-solfato, cheratan-solfato, condroitin-solfato, eparan-solfato), mentre i proteoglicani sono formati da un asse proteico a cui sono legati i GAG [102]. Lo zolfo è presente anche sulla membrana dell'ovocita e descrive l'abbondante presenza dei proteoglicani solfati, che sono i principali recettori dei segnali di crescita durante la maturazione dell'ovocita [103]. È stato anche dimostrato che uno dei GAG presenti sulla superficie dell'ovocita, l'eparan-solfato serve a legare le protamine sullo spermatozoo e induce la decondensazione della cromatina degli spermatozoi durante la fecondazione [104].

La quinta immagine descrive la concentrazione di osmio nel tessuto ovarico, che risulta presente in bassissima concentrazione e distribuito in maniera uniforme in tutte le cellule. Questi campioni contengono osmio perché sono stati preparati per il microscopio elettronico.

È necessario usare l'osmio durante la preparazione del campione in quanto esso è un forte ossidante; reagendo con i lipidi dei campioni li ossida, si riduce a biossido di osmio che è un composto molto elettronegativo, e permette quindi di evidenziare le membrane ed aumentare il contrasto con la TEM.

Questi risultati sono stati confermati dalle immagini di fluorescenza di tutte le altre sezioni del tessuto che abbiamo analizzato; come si può vedere nella Figura 12 le distribuzioni degli elementi risultano molto simili.

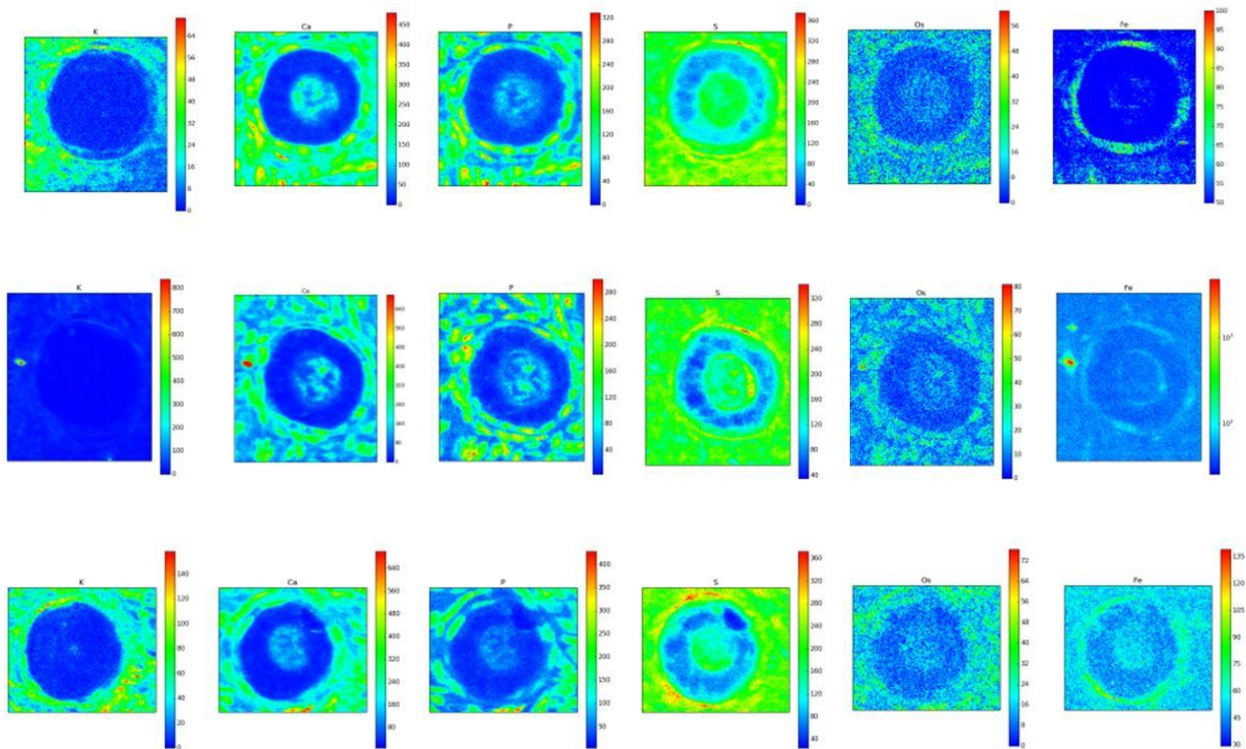


Figura 12: Mappe di intensità di fluorescenza di sezioni di tessuto ovarico fresco. Le condizioni sperimentali sono le stesse della figura 9, perciò le intensità di fluorescenza per ciascun elemento sono confrontabili.

Nella figura Figura 13 sono rappresentate le mappe di fluorescenza del campione crioconservato con il protocollo del congelamento lento.

In questo caso il tessuto scelto contiene tre follicoli primordiali; la distribuzione di calcio, ferro e fosforo appare molto simile a quanto visto per il tessuto di controllo. Anche le intensità di segnale in fluorescenza risultano paragonabili.

La mappa dello zolfo, invece, appare molto diversa rispetto a quanto visto nel tessuto di controllo. Si nota un'abbondanza dell'elemento a livello delle membrane degli ovociti mentre il segnale è come rarefatto nel tessuto connettivo circostante.

Il segnale dell'osmio invece risulta aumentato di quasi 50 volte, con una localizzazione specifica dell'elemento all'interno dei nuclei delle cellule stromali, delle cellule della granulosa e anche dell'ovocita.

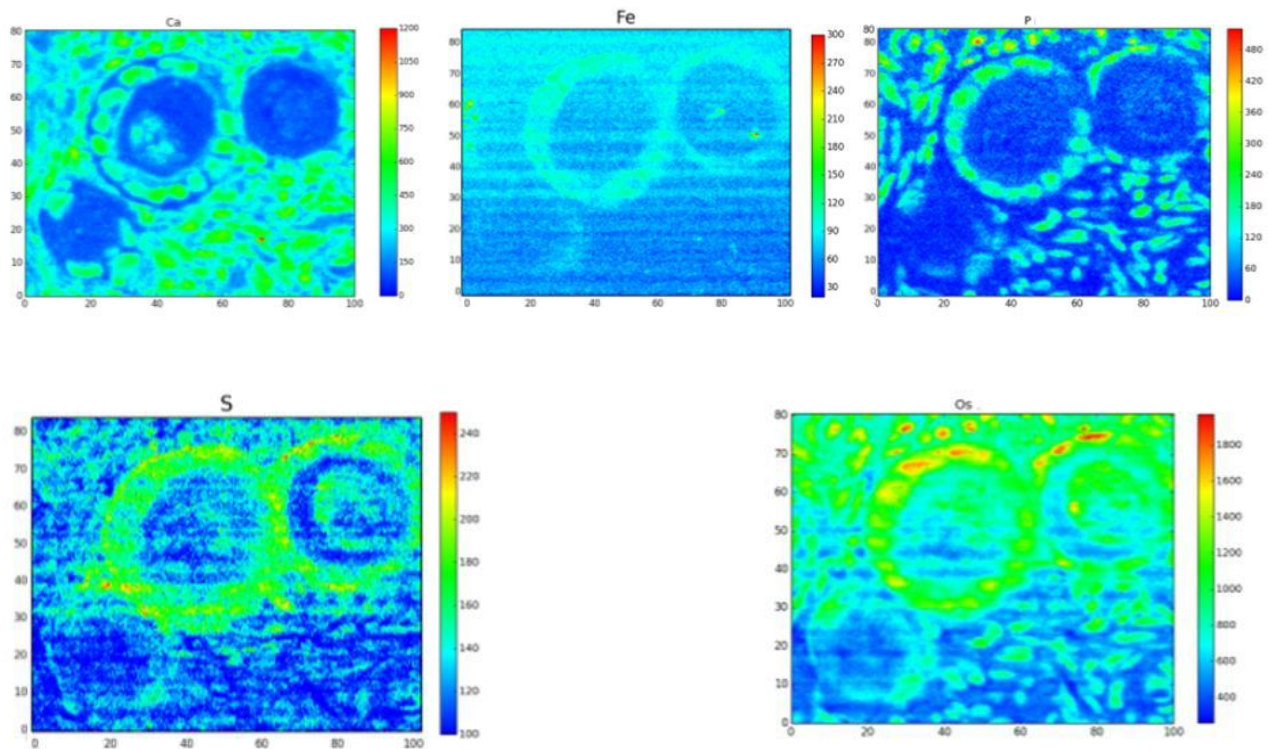


Figura 13: Spettromicroscopia XRF di sezioni di tessuto ovarico dopo congelamento lento: mappe XRF di calcio (Ca), ferro (Fe), fosforo (P), zolfo (S) e osmio (Os) mostrano la distribuzione dei vari elementi nel tessuto ovarico congelato con congelamento lento. Le mappe XRF sono state acquisite a 7.3 keV.

Anche per questi campioni le analisi sono state ripetute in altre sezioni e la distribuzione degli elementi risulta comparabile (Figura 14).

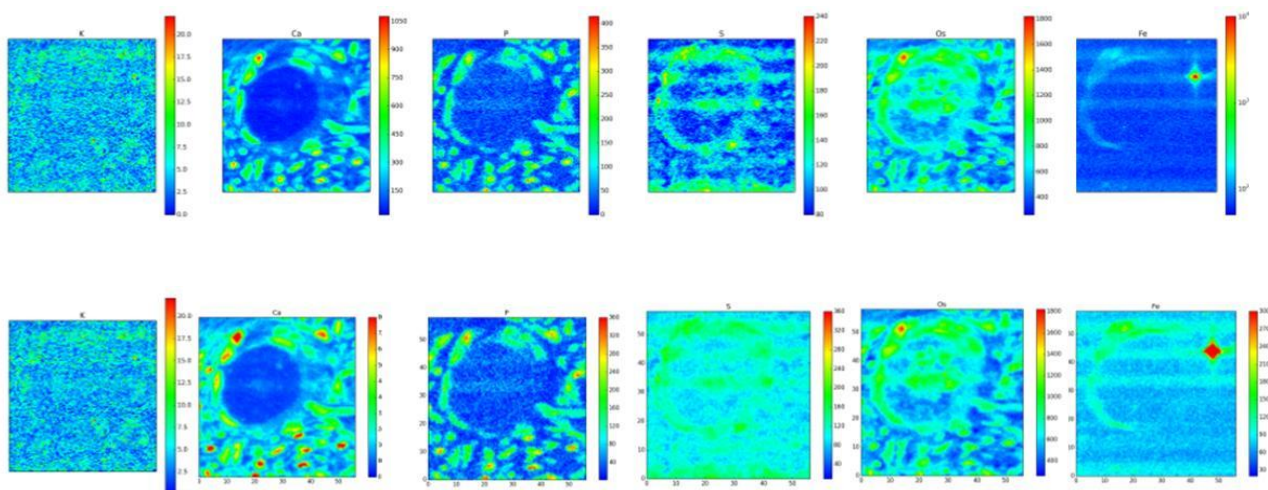


Figura 14: Mappe di intensità di fluorescenza di tessuto ovarico dopo congelamento lento. Stesse condizioni di analisi delle precedenti figure.

4.1.4 Confronto tra microscopia avanzata e microscopie tradizionali

Gli stessi campioni che sono stati misurati con la microspettroscopia sono poi stati valutati al microscopio ottico ed elettronico (Figura 15).

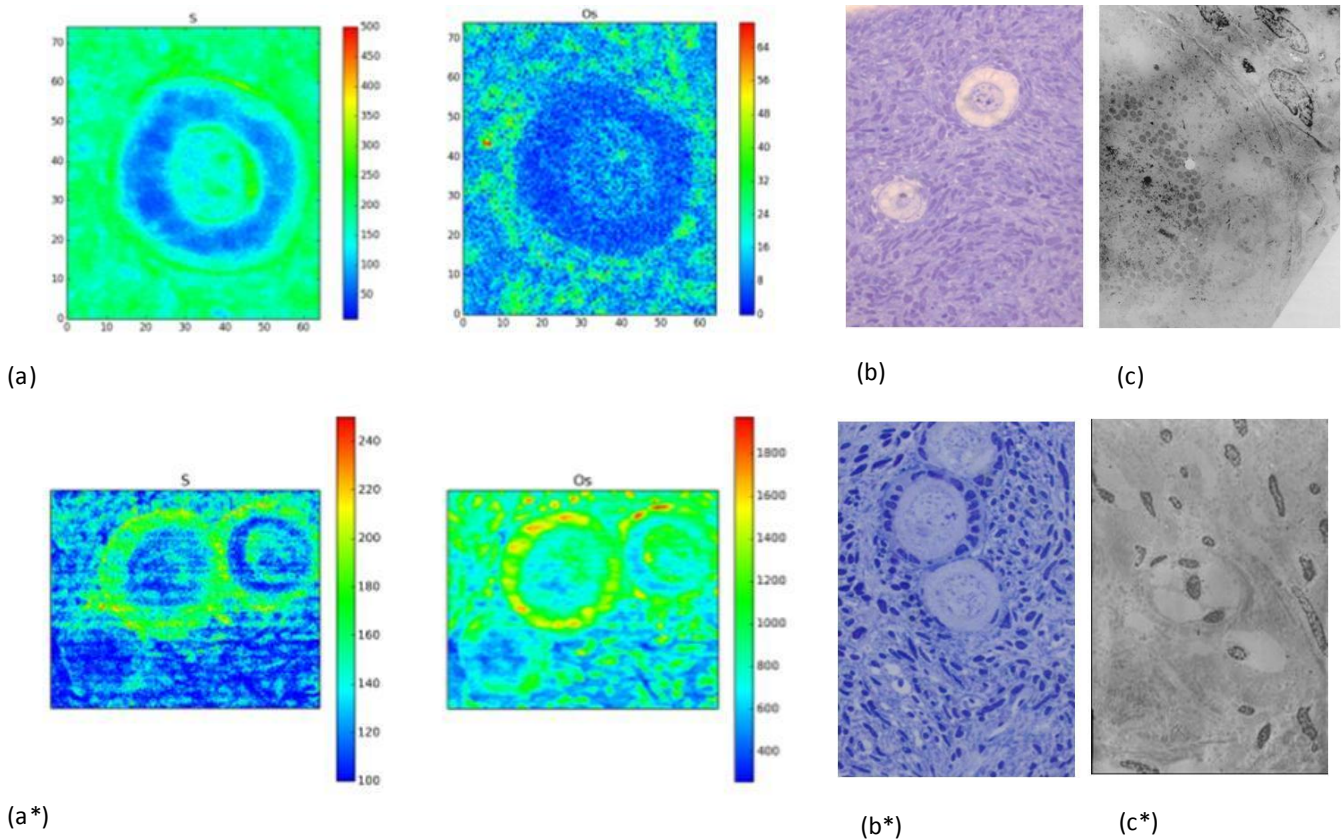


Figura 15: Confronto tra mappe XRF e immagini di microscopia tradizionale: distribuzione di zolfo e osmio (a,a*), immagine al microscopio ottico (b,b*) e al microscopio elettronico (c,c*) rispettivamente di tessuto ovarico fresco (sopra) e congelato (sotto).

E' interessante notare che le analisi in XRF confermano ed espandono le osservazioni della microscopia ottica e TEM. Nel tessuto congelato: laddove il microscopio ottico mostra che il tessuto connettivo non è più omogeneo bensì presenta una moltitudine di spazi, alcuni anche molto estesi, nelle mappe XRF corrisponde una rarefazione della distribuzione dello zolfo che indica parziale rimodellamento della matrice extracellulare. L'immagine al TEM rafforza queste osservazioni mostrando ampi vacuoli sia all'interno sia all'esterno dei fibroblasti.

È interessante anche il comportamento dell'osmio, una sostanza di cui non si può fare a meno per ottenere delle buone immagini morfologiche al TEM. L'esponenziale accumulo di osmio nei tessuti fissati dopo congelamento lento fa intuire un'aumentata permeabilità del tessuto probabilmente dovuta al criodanno a livello delle membrane e alla rarefazione della matrice extracellulare.

Questa ulteriore osservazione suggerisce che le microscopie avanzate con luce di sincrotrone sono un valido supporto e un nuovo promettente approccio per valutare e meglio comprendere il danno da congelamento nei tessuti ovarici.

4.2 Nuovi approcci per la valutazione del danno da congelamento negli spermatozoi

4.2.1 Studio di fattibilità dell'uso della spettroscopia vibrazionale FTIR per valutare il danno ossidativo negli spermatozoi

La reazione di Fenton è frequentemente usata in modelli di cellule vive per riprodurre le condizioni di stress ossidativo in maniera da studiare gli effetti molecolari da esso derivanti e comparare la risposta a farmaci o ad agenti tossici.

Nel nostro studio, i campioni di liquido seminale sono stati esposti a differenti quantità di reagente di Fenton in maniera da produrre crescenti livelli di danno ossidativo: percentuali 10, 20, 30% (come descritto nei materiali e metodi).

Prima delle misurazioni, sia i campioni di controllo sia quelli trattati, sono stati fissati con paraformaldeide (PFA): la fissazione è necessaria per ottenere un campione idoneo, poiché la motilità degli spermatozoi potrebbe compromettere la misurazione. La PFA inoltre preserva bene il contenuto e l'arrangiamento spaziale dei lipidi e delle proteine cellulari e mantiene la conformazione del DNA anche dopo la reidratazione [87, 105].

È noto che durante la disidratazione il DNA cambia, passando dalla forma B alla forma A, ad elica. Questo cambiamento, nello spettro infrarosso, si riflette in uno spostamento del picco dello stretching asimmetrico dei gruppi fosfato (da 1220-1230 cm^{-1} a 1230-1240 cm^{-1}) e nella scomparsa della banda centrata a 1080 cm^{-1} , relativa allo stretching simmetrico dei fosfati; portando chiaramente a mal interpretare la conformazione dell'acido nucleico.

Per il nostro lavoro, quindi i campioni sono stati risospesi con soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) in maniera da mantenerli idratati durante le misurazioni. Poiché il nostro interesse è quello di valutare il danno al DNA indotto da stress ossidativo, abbiamo preferito usare la soluzione fisiologica al PBS, in modo da eliminare la sovrapposizione della banda di stretching dei fosfati inorganici, con la banda dello stretching simmetrico e asimmetrico dei fosfati del DNA e dell'RNA [106].

Il limite di diffrazione della FTIR permette una risoluzione laterale micrometrica rendendo così impossibile fare l'analisi su singolo spermatozoo. Il setup del

microscopio che abbiamo usato ci ha però permesso di selezionare un'area del campione di 25X25 micron, in maniera da acquisire gli spettri su gruppi di 20-40 spermatozoi; operando sotto un microscopio, ci è stato possibile valutarne il numero e la morfologia.

Nella figura 16 sono rappresentati lo spettro di assorbanza nell'infrarosso e la corrispondente derivata seconda; la media degli spettri dei campioni di controllo è rappresentato da una linea nera e la sua ombreggiatura rappresenta la deviazione standard delle misurazioni. Il profilo vibrazionale che si riconosce in questo spettro è caratteristico delle cellule nemaspermiche.

I picchi più intensi dello spettro sono centrati a 1653 e 1548 cm^{-1} e sono rispettivamente chiamati Amide I e Amide II. Il primo picco deriva principalmente dallo stretching vibrazionale del legame C=O dello scheletro peptidico, mentre il secondo picco dallo stretching del legame N-H accoppiato al legame C-N delle proteine cellulari. La loro posizione rivela che la conformazione delle proteine negli spermatozoi umani è prevalentemente ad α -elica, con una percentuale minore di strutture a β -foglietto. Questo dato è confermato dalla spalla della derivata seconda centrata a 1626 e 1517 cm^{-1} rispettivamente dell'Amide I e dell'Amide II. Questi elementi sono in accordo con la letteratura sull'argomento [107, 108].

A confronto con gli spettri FTIR di altre cellule di mammifero, le bande di Amide sono meno intense rispetto alle bande centrate a 1227 cm^{-1} , 1086 cm^{-1} , 968 cm^{-1} relative al contenuto di acido nucleico cellulare.

La prima banda, 1227 cm^{-1} , è quella dello stretching asimmetrico dello scheletro di fosfati del DNA; la banda dell'RNA, invece, dovrebbe cadere a circa 1235 cm^{-1} , ma il suo contributo è minimo e infatti non è riconoscibile sulla derivata seconda dello spettro.

Questo fenomeno è dovuto alla proporzione relativa dei due acidi nucleici negli spermatozoi, che è diversa rispetto alle altre cellule. La struttura degli spermatozoi, infatti, riflette l'unico scopo di trasportare il DNA paterno all'ovocita e nonostante l'importante ruolo dell'RNA nell'embriogenesi, la quantità di RNA totale negli spermatozoi è circa di due ordini di grandezza più basso che negli ovociti o in altre cellule di mammifero [109].

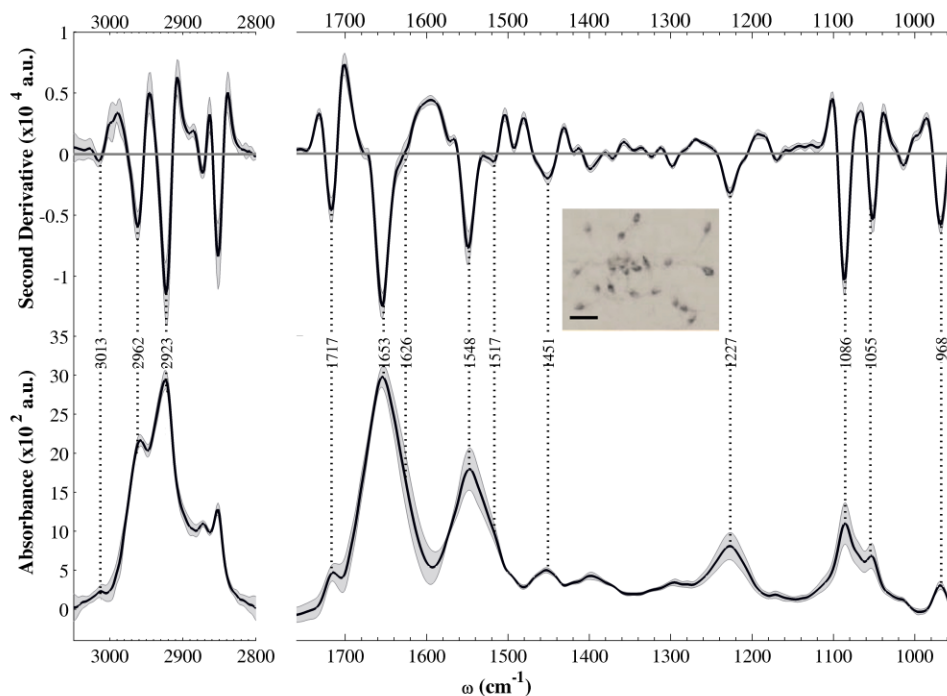


Figura 16: Spettro FTIR degli spermatozoi di controllo, assorbanza media e derivata seconda (linea nera continua). Le regioni ombreggiate rappresentano la deviazione standard degli spettri raccolti nella regione spettrale 3050-2800 e 1800-920 cm^{-1} . La figura interna rappresenta un gruppo di spermatozoi di controllo al microscopio ottico (Hyperion 3000 Vis-IR microscope). (*scale bar* =10 μm)

Queste considerazioni, inoltre sono rafforzate dall'analisi della forma della banda centrata a 1086 cm^{-1} , attribuita allo stretching simmetrico dello scheletro di fosfati del DNA. Il contributo al picco, centrato a 1115 cm^{-1} è appena distinguibile rispetto a quello che succede nelle altre cellule di mammifero. Questa banda descrive lo stretching vibrazionale del C-O dei gruppi C-OH del ribosio dell'RNA [110] e la sua bassa intensità è in linea con le precedenti osservazioni.

Il picco centrato a 1055 cm^{-1} identifica lo stretching del C-O dei gruppi C-OH degli oligo e polisaccaridi [111].

Infine la banda centrata a 968 cm^{-1} è la banda dello stretching vibrazionale dei gruppi C-O e C-C degli acidi nucleici, così come dello stretching simmetrico dei fosfati monoesteri dianionici delle proteine fosforilate.

La capacitazione degli spermatozoi induce la fosforilazione di varie proteine, in particolare dei residui di tirosina, che sono importanti per la motilità cellulare [112].

Quindi per studi futuri, analizzando i cambiamenti di intensità di questa banda (968 cm^{-1}), si potranno andare a valutare alterazioni della motilità e del potenziale di fertilizzazione.

La regione dello spettro con frequenze più alte identifica lo stretching simmetrico e asimmetrico dei gruppi metili e metileni delle catene alifatiche. L'intensità di questa banda deriva soprattutto dalle catene laterali degli aminoacidi e dalle catene degli acidi grassi dei fosfolipidi.

È importante ricordare che la concentrazione relativa di fosfolipidi negli spermatozoi è più bassa che nelle altre cellule di mammifero; infatti la banda centrata a circa 1740 cm^{-1} , propria dello stretching degli esteri carbonili dei fosfolipidi, ha una intensità molto bassa come già dimostrato da Barcot *et al.* [108].

Infine i gruppi $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ con lo stretching del gruppo C-N delle basi degli acidi nucleici contribuiscono alla forma dello spettro nella regione spettrale $1500\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$. Nella Figura 17 possiamo vedere gli spettri della media delle assorbanze per tutti i campioni esposti al Fenton- FeSO_4 . Gli spettri ottenuti dai campioni trattati sono estremamente diversi dal controllo, soprattutto nella regione dello spettro a $1150\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$; questi dati sono in accordo con quanto visto dal gruppo di Sanchez *et al.* [76] che ha valutato, su cellule a secco, l'effetto del danno ossidativo indotto dal reagente di Fenton, confrontando la spettroscopia FTIR con la spettromicroscopia Raman. In particolare, si nota un aumento dell'intensità relativa del picco a 1013 cm^{-1} rispetto al picco a 1086 cm^{-1} ; e questo andamento correla con il danno al DNA che ci si aspetta aumentando la concentrazione del reagente di Fenton.

Abbiamo inoltre notato che aumentando le condizioni ossidative dal 10% al 30% la forma del picco a 1086 cm^{-1} progressivamente si allarga e domina l'intero profilo dello spettro, soprattutto alle concentrazioni di Fenton più alte.

Tuttavia, l'andamento dell'intensità della banda tra $1150\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ non sembra molto naturale e difficilmente è attribuibile solamente ad un danno al DNA. Infatti, in conseguenza alla frammentazione del DNA, ci saremmo aspettati una diminuzione dell'intensità del picco che si riferisce agli acidi nucleici.

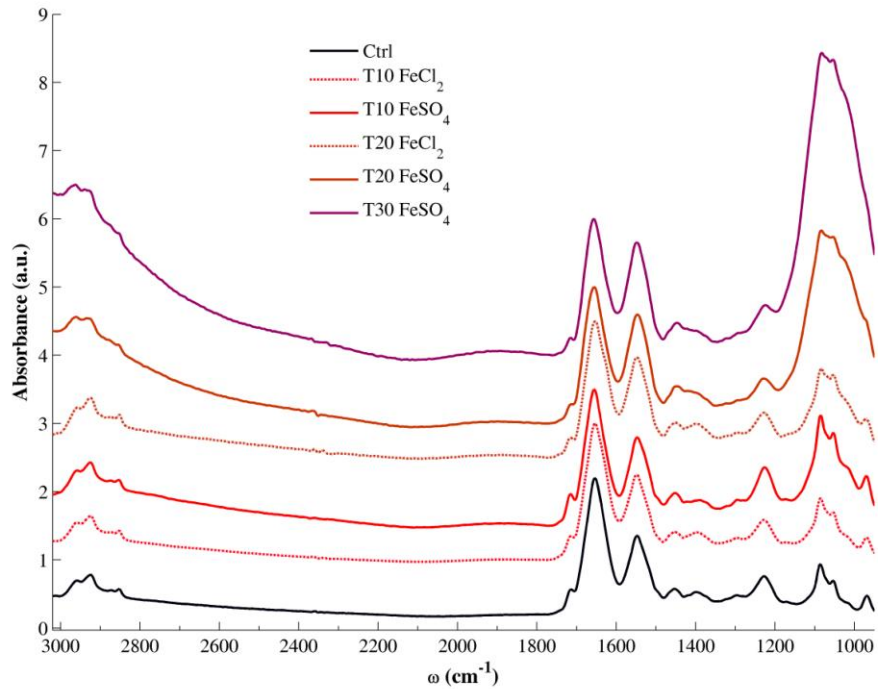


Figura 17: Spettri FTIR dell'assorbanza media, nella regione spettrale 3020-920 cm^{-1} , dei campioni di controllo (Ctrl) e dei campioni trattati con reagente di Fenton- SO_4 10% (T10 FeSO_4), 20% (T20 FeSO_4) e 30% (T30 FeSO_4). Spettri dei campioni trattati con Fenton- Cl_2 10% (T10 FeCl_2) e 20% (T20 FeCl_2). Gli spettri sono stati sperati per una miglior comprensione.

Quest' osservazione ha indotto a chiederci se i componenti del reagente di Fenton contribuiscono in qualche maniera a questi cambiamenti che notiamo nello spettro infrarosso.

La Figura 18 mostra lo spettro del reagente di Fenton- FeSO_4 preparato con soluzione fisiologica; nelle frequenze più basse lo spettro è dominato dal contributo dell'anione solfato: in particolare si nota a livello delle bande a 1113, 1080 e 983 cm^{-1} [113] che possono potenzialmente interferire con i nostri dati.

Tuttavia, nelle soluzioni di Fenton con NaCl 0.9% che abbiamo usato non sono stati notati dei precipitati e, nelle regioni di buffer analizzate vicino agli spermatozoi non ci sono evidenze di picchi attribuibili ai gruppi solfati. Questo ci permette di escludere un contributo diretto del reagente di Fenton sullo spettro caratteristico degli spermatozoi. Abbiamo poi voluto consolidare questo concetto analizzando dei campioni di spermatozoi trattati con reagente di Fenton- FeCl_2 , preparato con soluzione fisiologica. Questi campioni risultano avere lo stesso andamento dei campioni trattati con Fenton- FeSO_4 (Figura 17).

Peraltro lo spettro del Fenton-FeCl₂, in soluzione fisiologica, non possiede dei picchi che si sovrappongono alla regione di nostro interesse (Figura 18).

Abbiamo infine testato i reagenti di Fenton (FeSO₄ e FeCl₂) preparati con il PBS; in entrambe le soluzioni abbiamo notato dei precipitati e i profili degli spettri hanno caratteristiche comparabili (Figura 18): un picco allargato a 1033 cm⁻¹ che può essere assegnato con sicurezza ai gruppi fosfato [114].

Il fatto che le regioni di buffer (spazi dove non ci sono spermatozoi) non mostrano picchi riferibili ai gruppi fosfato, indica che il cambio di buffer da PBS a soluzione fisiologica è realmente efficiente; questo ci ha però fatto quindi ipotizzare che, piccoli aggregati di ferro derivanti dalle soluzioni di Fenton si legano agli spermatozoi e precipitano come sali di fosfato dopo la fissazione; infatti nel nostro esperimento l'unica fonte di gruppi fosfato deriva dalla soluzione di fissazione, che però è stata usata dopo l'induzione dello stress ossidativo.

La presenza di aggregati ferro-fosfati legati alla superficie delle cellule nemaspermiche è stata anche confermata dalla microscopia a raggi X e dalla microspettroscopia XRF, come è descritto nel paragrafo successivo.

In generale, il contributo dei precipitati ferro-fosfato negli spettri dei campioni danneggiati ci permette di dare una nuova interpretazione ai risultati presentati nella Figura 17.

In presenza di un basso danno ossidativo (T10), i cambiamenti dello spettro a 1150-1000 cm⁻¹ derivano dalla combinazione delle modificazione del DNA e dalla formazione dei precipitati; questi risultati sono simili a quanto visto da Sanchez et al [76].

A concentrazioni più alte di Fenton, invece, il contributo dai gruppi fosfato a questi picchi (che deriva dal PBS presente nel fissativo), diventa dominante e spiega quindi la sproporzione tra le loro intensità di cui si è discusso in precedenza.

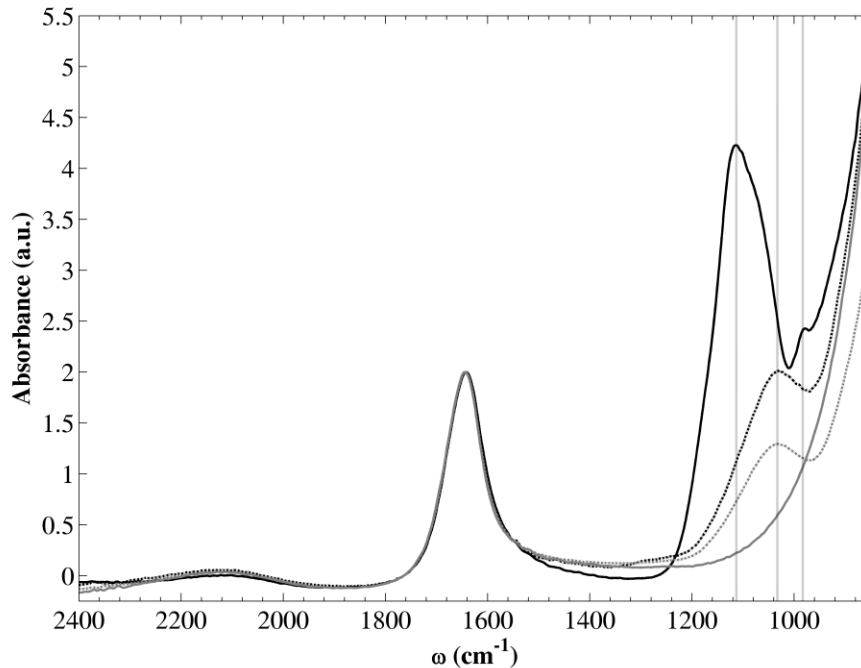


Figura 18: spettro rappresentativo del reagente di Fenton-SO₄ (colore nero) e Fenton-Cl₂ (colore grigio), preparato con soluzione fisiologica (linea continua) e PBS (linea a punti) nella regione spettrale 2400-900 cm⁻¹.

Microscopia raggi X: μ XRF per rivelare la presenza di ferro sugli spermatozoi

Sui campioni trattati e sui campioni di controllo, sono state eseguite analisi con la spettroscopia microXRF, per poter identificare la presenza, la composizione e il contenuto dei precipitati di ferro che coprono e si attaccano agli spermatozoi.

Per queste analisi i campioni sono stati preparati come per le analisi FTIR tranne per il fatto che la soluzione è stata fatta asciugare su finestre di Si₃N₄ prima delle misure.

La Figura 19 mostra le immagini di assorbimento (pannello Abs1 e Abs) e contrasto di fase (PhC1 e PhC) sia degli spermatozoi di controllo che di quelli trattati con Fenton-FeSO₄ 10%.

Per entrambi i campioni è presente anche una mappa degli elementi che mostra la distribuzione di ossigeno (O), sodio (Na), magnesio (Mg), e ferro (Fe).

Per avere un buon segnale XRF le mappe sono state acquisite con una risoluzione spaziale di 500 nm, quindi appaiono meno definite delle altre immagini.

Usando una risoluzione spaziale di 250 nm, nelle cellule trattate si notano alcuni cambiamenti morfologici simili a dei piccoli grani sulla superficie delle cellule. Per quanto riguarda la mappatura degli elementi: sodio e magnesio mostrano

concentrazioni simili in entrambi i campioni e sono indicativi della morfologia e dello spessore della cellula.

Nel campione di controllo la concentrazione del ferro è molto bassa. Esso si localizza a livello della testa e del collo dello spermatozoo; nei campioni trattati la concentrazione di Fe è notevolmente maggiore (circa dieci volte di più) e si trova a livello di testa, collo, corpo, coda e nelle regioni prossimali dello spermatozoo (pannello Fe1 e Fe2).

Anche la concentrazione di ossigeno è più elevata, di circa quattro volte, nei campioni trattati (pannello O1 e O2) rispetto al controllo (pannello O) e la sua distribuzione è simile a quella vista per il ferro.

Questi dati dimostrano che sugli spermatozoi sono presenti dei precipitati di ferro, che contengono anche ossigeno; e sono chiaramente in linea con quanto visto nelle misurazioni FTIR.

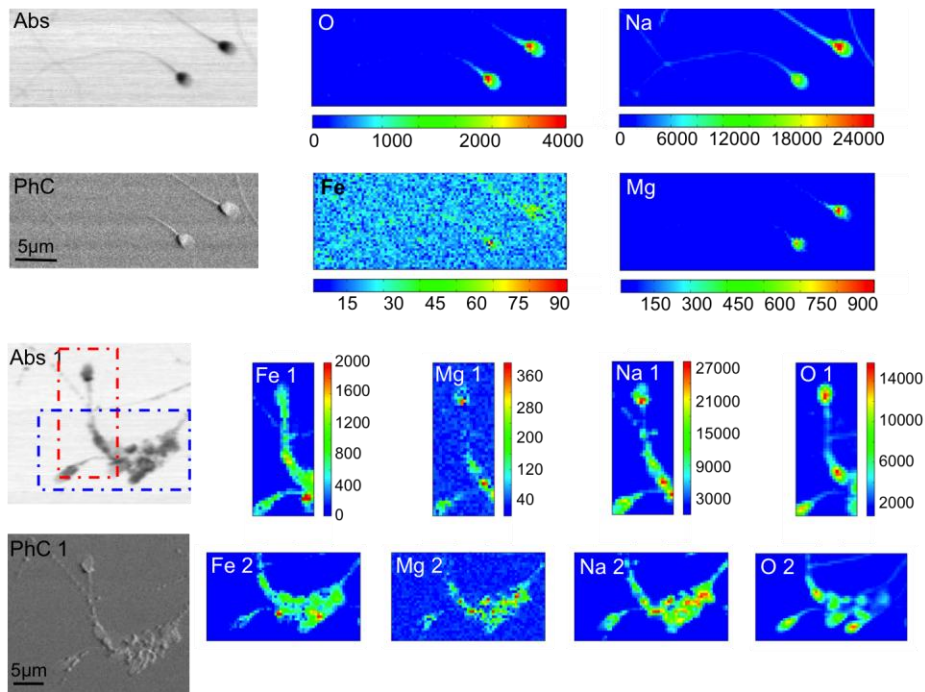


Figura 19: Immagini di assorbimento (pannelli Abs1 e Abs) e contrasto di fase (pannelli PhC1 e PhC) rispettivamente dei campioni trattati e dei campioni di controllo; queste immagini sono state raccolte con una risoluzione spaziale e uno spot size dei raggi X di 250 nm. Mappe di assorbimento XRF di ossigeno, sodio, ferro e magnesio dei controlli (pannello O, Na, Fe e Mg) e dei campioni trattati (O1, O2, Na1, Na2, Fe1, Fe2, Mg1 e Mg2); Le mappe sono state acquisite usando un'energia di 1.4 keV e risoluzione spaziale e spot size dei raggi X di 500 nm.

4.2.2 Valutazione del danno al DNA con un metodo tradizionale: stress ossidativo vs congelamento

Dieci campioni di liquido seminale normospermici sono stati divisi in due aliquote; nel primo gruppo è stato valutato il danno al DNA causato dalla criopreservazione mentre nel secondo gruppo il danno al DNA causato da un agente ossidante.

Esistono vari test per determinare il danno al DNA sia in maniera diretta che indiretta; la maggior parte di questi test però richiedono tempistiche molto lunghe e strumentazioni costose [91]; nel nostro lavoro abbiamo deciso di usare la colorazione con arancio di acridina perché è un test economico, molto veloce da effettuare e che richiede solo l'uso di un microscopio a fluorescenza.

Ci sono però degli svantaggi, riportati in letteratura [73], legati a questa tecnica: la conta degli spermatozoi deve essere fatta molto velocemente perché la colorazione tende ad attenuarsi fino a sparire in pochi minuti e la difficile classificazione dei colori da parte dell'operatore.

Questi problemi si riescono a risolvere usando, per la conta delle cellule, un citofluorimetro; ma come spiega una recente lavoro di Mohammed *et al.* [115] i risultati tra le due metodiche sono correlabili e soprattutto il citofluorimetro è molto costoso e prevede delle tempistiche molto lunghe, quindi risulta poco pratico da applicare nella pratica clinica [91].

I dati nella Tabella 4 descrivono i parametri medi dei campioni seminali pre e post congelamento (un totale di 10 campioni); tutti i parametri risultano diminuiti dopo il trattamento e parallelamente si nota un aumento dell'indice di frammentazione del DNA (DFI). Le medie delle concentrazioni ($55 \cdot 10^6$ vs $40 \cdot 10^6$), delle vitalità (67% vs 41%) e dell'integrità del DNA (78% vs 54%) sono più basse dopo il congelamento, rispetto ai campioni freschi.

I risultati sono in linea con diversi lavori presenti in letteratura [91, 115, 116] dove si dimostra che la crioconservazione del liquido seminale pur essendo una metodica standardizzata, e ampiamente usata, causa un peggioramento nella qualità degli spermatozoi, che correla con una minor fertilità.

	Pre-congelamento	Post-congelamento
Concentrazione (*10 ⁶)	55.14±16.90	39.71±16.05
Vitalità (%)	66.85±8.97	41.42±10.16
Integrità DNA (%)	78.14±10.23	54.28±12.16
DFI (%)	22.15±10.41	46.65±12.66

Tabella 4: parametri del liquido seminale prima e dopo congelamento/scongelamento (media±SD)

Nella Tabella 5 sono presentati i parametri dei campioni sottoposti a danno ossidativo con il reattivo di Fenton (nelle percentuali 10%, 20%, 30%); abbiamo utilizzato nuovamente questo modello di stress ossidativo per poter poi fare un confronto con gli esperimenti precedenti.

Come ci aspettavamo di vedere, in questa condizione sperimentale l'integrità del DNA (78% vs 64% vs 43% vs 20%) diminuisce all'aumentare della concentrazione dell'agente ossidante (0%, 10%, 20%, 30%), mentre il DFI si comporta in maniera esattamente inversa.

	Controllo	Fenton 10%	Fenton 20%	Fenton 30%
Integrità DNA (%)	78.14±10.23	63.66±6.02	42.75±10.56	20.05±5.8
DFI (%)	22.15±10.41	36.33±6.03	52.25±10.56	79.5±5.8

Tabella 5: parametri del liquido seminale sottoposto a condizioni crescenti di danno ossidativo con reagente di Fenton.

Lo stress ossidativo, che induce la produzione di radicali dell'ossigeno (ROS), è la causa principale del danno al DNA negli spermatozoi [16, 64]. I ROS danneggiano anche le proteine e lipidi delle membrane degli spermatozoi, compromettendo la loro funzionalità e abbassando il potenziale di fertilizzazione degli stessi [117]. Inoltre è stato ampiamente dimostrato che trattando i pazienti con antiossidanti si riesce a diminuire la frammentazione del DNA [65, 67].

Il danno al DNA, sempre prodotto dai radicali liberi, è una delle cause principali della riduzione del potenziale di fertilità, del blocco dello sviluppo embrionale e dell'aumento dei tassi di aborto spontaneo [118].

Questi esperimenti sono stati effettuati per capire se il danno ossidativo è un buon modello di danno al DNA e se è comparabile al danno indotto dalla criopreservazione. Dai risultati ottenuti (Tabella 5) si può poi notare che nella condizione ossidativa con Fenton 20% troviamo valori di DFI (52.25 ± 10.56) simili a quelli misurati dopo congelamento e scongelamento degli stessi campioni (46.65 ± 12.66).

Possiamo quindi affermare che le condizioni del danno da congelamento al DNA sono valutabili con la spettroscopia FTIR perché rientrano nel range dello stress ossidativo, che come già descritto è rilevabile con la spettroscopia vibrazionale.

5.CONCLUSIONI

La preservazione della fertilità, attraverso la crioconservazione dei gameti, dà la possibilità di mantenere la capacità riproduttiva a tutti quei pazienti che rischiano di diventare sterili. Questo campo della medicina era inizialmente rivolto alle persone malate di cancro che, dovendosi sottoporre a trattamenti gonadotossici (chemio/radioterapia), una volta guariti avevano così la possibilità di concepire.

Sia negli uomini sia nelle donne però, sono molte le patologie, anche benigne, che possono causare sterilità. Proprio per questi motivi negli ultimi anni questo ambito della ricerca ha avuto un importante sviluppo volto a migliorare le procedure esistenti e a permettere ad un maggior numero di pazienti di poter beneficiare di queste tecniche.

Le donne, per preservare la loro fertilità, hanno la possibilità di crioconservare ovociti o embrioni; queste tecniche vengono considerate procedure standard, in quanto vengono usate con successo già da molti anni nei reparti di Procreazione Medicalmente Assistita. Il grande svantaggio è che richiedono tempi lunghi per la loro riuscita e sono applicabili solamente a donne adulte.

Un'altra possibilità, che però è ancora una metodica sperimentale, è la criopreservazione del tessuto ovarico. Tramite laparoscopia si preleva il tessuto, che nella parte corticale contiene una gran quantità di follicoli primordiali, si taglia in piccole strisce e si congela. I promettenti risultati acquisiti negli ultimi anni l'ha resa un'opzione sempre più concreta per preservare la fertilità in particolari condizioni: essa infatti rappresenta l'unica possibilità di procreare per bambine, pazienti prepuberi e pazienti con tumori ormono-sensibili. Un altro vantaggio di questa metodica è che il prelievo può essere eseguito in qualsiasi momento del ciclo mestruale senza la necessità di ritardare le eventuali terapie farmacologiche.

I punti critici nella criopreservazione del tessuto ovarico dipendono dal fatto che, essendo questo un tessuto, è formato da vari tipi cellulari (ovociti, cellule della granulosa e cellule dello stroma) che hanno diverse proprietà e che rispondono in maniera diversa alla disidratazione e reidratazione durante il processo di congelamento/scongelo.

Quindi per rendere la criopreservazione della corticale ovarica, una procedura clinica utilizzabile sulle pazienti che rischiano di divenire sterili, la ricerca si sta focalizzando sull'ottimizzazione e la standardizzazione dei protocolli in maniera da preservare l'integrità dell'intero tessuto.

Finora tutti i casi di nascite riportate in letteratura derivano da tessuto ovarico criopreservato usando il congelamento lento [119]; ma il costo molto elevato della strumentazione necessaria e le diverse ore richieste per l'attuazione della tecnica sono i principali problemi associati a questa metodica.

Negli ultimi dieci anni è stata sviluppata un'altra tecnica, la vitrificazione, che ha dato ottimi risultati nel congelamento di ovociti ed embrioni; oltretutto la vitrificazione è una tecnica semplice, veloce e che può essere svolta anche durante gli interventi chirurgici [15].

I lavori presenti in letteratura che comparano congelamento lento e vitrificazione non sono molti, e conducono a conclusioni molto discordanti; alcuni risultati indicano che la vitrificazione del tessuto ovarico è meno efficiente del congelamento lento [36, 37], perché quest'ultimo preserva meglio i diversi tipi cellulari presenti nell'ovaio.

Un'altra indagine dimostra invece che i risultati della vitrificazione sono comparabili con quelli del congelamento lento [40]; e lo stesso gruppo, alcuni anni dopo, ottiene migliori risultati con il metodo della vitrificazione, perché nonostante il congelamento lento preservi bene gli ovociti e le cellule della granulosa nota una minor sopravvivenza delle cellule stromali [47].

Negli studi di questo dottorato sono stati confrontati due protocolli: uno di vitrificazione e uno di congelamento lento che sono stati valutati in parallelo sul tessuto della stessa paziente. L'integrità morfologica dei follicoli e delle cellule stromali dopo lo scongelamento è stata valutata con il microscopio ottico (LM) e il microscopio elettronico a trasmissione (TEM), che al momento sono gli strumenti più usati per valutare la qualità del tessuto ovarico, sia in modelli animali che nell'uomo [45].

Le valutazioni morfologiche e ultrastrutturali hanno rivelato che i protocolli che abbiamo usato mantengono un'ottima preservazione dell'ovociti, influenzano in parte le cellule della granulosa mentre alterano in maniera importante le cellule dello stroma. Risultati simili sono stati ottenuti anche da altri gruppi in letteratura [38, 46].

La vitrificazione sembra però complessivamente preservare meglio l'intero tessuto ovarico. Al microscopio ottico la vitalità dei follicoli vitrificati è comparabile con il tessuto fresco, mentre il danno dopo congelamento lento risulta invece significativo ($p < 0.05$). Al TEM gli ovociti appaiono normoconformati e non presentano vacuoli all'interno del citoplasma come invece si nota negli ovociti congelati con il congelamento lento; anche le cellule della granulosa, seppur influenzate, presentano meno vacuoli e meno estesi. Inoltre, il tessuto connettivo risulta significativamente meglio conservato con la vitrificazione ($p < 0.001$) rispetto al congelamento lento; infatti con il microscopio ottico si vede una minor vacuolizzazione e una minor rarefazione delle cellule stromali e della matrice extracellulare. Le analisi al TEM confermano che i campioni vitrificati hanno fibroblasti con un minor numero di vacuoli intracellulari che sono mediamente di più piccole dimensioni rispetto ai campioni dopo congelamento lento.

Abbiamo poi implementato i nostri risultati morfologici ed ultrastrutturali sul tessuto ovarico con delle analisi effettuate con la microspettroscopia XRF presso il Sincrotrone Europeo (ESRF) di Grenoble, al fine di meglio indagare la natura del danno provocato da congelamento e scongelamento. E' emerso che nel tessuto congelato, rispetto al tessuto fresco, c'è una diversa distribuzione degli elementi, soprattutto per zolfo e osmio. In particolare, nel tessuto congelato, il segnale dello zolfo, che deriva da glicosaminoglicani solforati della matrice extracellulare, è più basso e soprattutto ha una distribuzione disomogenea. Questo conferma ciò che avevamo osservato dall'analisi al TEM nello stroma del tessuto criopreservato: rarefazione delle cellule e presenza di vacuoli estesi.

Abbiamo notato inoltre una diversa distribuzione dell'osmio, elemento presente in quanto necessario come contrasto per le analisi al TEM; esso è cinquanta volte più concentrato nel tessuto congelato ed è in accordo con un'aumentata permeabilità del tessuto causata dalla rarefazione della matrice extracellulare e il danneggiamento delle membrane durante la criopreservazione.

Queste osservazioni suggeriscono che le microscopie avanzate con luce di sincrotrone, affiancate alle microscopie tradizionali, potrebbero essere un nuovo promettente approccio per valutare e studiare il criodanno nei tessuti, usando per esempio la valutazione dello zolfo e dell'osmio come indice di danneggiamento.

Per gli studi futuri sarebbe interessante usare l'XRF e una spettroscopia simile qual è la PIXE sotto set-up che prevedono dei *criostage* per mantenere il campione a -196°C , permettendo così di analizzare i campioni mantenendoli congelati. Questo tipo di approccio sarebbe particolarmente adatto per capire se i danni dovuti alla criopreservazione avvengono principalmente durante il congelamento o magari durante il processo di scongelamento. A questo proposito abbiamo già sottomesso un *proposal*, che è stato accettato ad ESRF, per continuare il nostro studio anche sui campioni vitrificati. Inoltre abbiamo effettuato, in collaborazione con l'Università Josef Stefan di Lubiana, alcuni studi preliminari usando la PIXE.

In conclusione, tenendo conto che lo scopo finale delle criopreservazione della corteccia ovarica è rappresentato dal concepimento, dalla gravidanza e dalla nascita di bambini, è necessario molto tempo al fine di verificare se e come le procedure di vitrificazione funzionino in termini di successo delle nascite. Infatti il numero di trapianti eseguiti con questa tecnica in tutto il mondo è ancora basso [30].

Nonostante la vitrificazione sia una metodica veloce e poco costosa e abbia mostrato risultati incoraggianti negli animali e nell'uomo [92], il congelamento lento, pur presentando una bassa sopravvivenza delle cellule stromali e una compromissione della loro funzionalità [120], al momento attuale è la metodica più utilizzata. Infatti, tutti i casi di nascite riportate derivano da tessuto ovarico criopreservato usando questa metodica [119].

Per quanto riguarda la preservazione della fertilità degli uomini, il congelamento del liquido seminale ad oggi è l'unico metodo usato nelle cliniche, ma presenta delle criticità; è ben noto in letteratura, infatti, che il congelamento peggiora la qualità del liquido seminale. In particolare i cambiamenti di pressione osmotica che avvengono durante il processo vanno a danneggiare le membrane, causando una diminuzione della motilità degli spermatozoi e una diminuzione della concentrazione, che portano ad una perdita del potenziale di fertilizzazione [116]; negli ultimi anni si è inoltre scoperto che il congelamento causa anche danni al DNA [16].

Il danno al DNA degli spermatozoi viene causato anche da molteplici condizioni ambientali quali: farmaci, inquinamento, fumo di sigaretta, pesticidi, agenti chimici, alte temperature; e da alcune patologie: criptorchidismo, febbre, invecchiamento, infezioni, chemioterapia, cancro e varicocele [115].

È emerso da vari studi che i parametri standard per valutare il liquido seminale (concentrazione, motilità, vitalità, morfologia) non sono dei buoni predittori riguardo la competenza funzionale dello spermatozoo e quindi della riuscita di una gravidanza [71]. Risulta così necessario affiancare alle analisi standard anche dei test per la valutazione del danno al DNA [72], perché per far sì che nascano bambini sani, spontaneamente o con l'aiuto di tecniche di PMA, è necessario che quest'ultimo non sia danneggiato.

Le analisi preliminari che abbiamo effettuato sul liquido seminale con la spettromicroscopia FTIR, hanno rilevato il potenziale di questa tecnica per identificare i danni al DNA causati da un agente ossidativo. I nostri risultati sono parzialmente in accordo con il lavoro di Sanchez *et al.*[76] che ha valutato la qualità degli spermatozoi su cellule a secco.

È importante infatti ricordare che informazioni corrette sulla conformazione del DNA possono essere ottenute solo lavorando in condizioni di idratazione [87]; per il nostro gruppo è stato possibile ottenere queste condizioni grazie alla costruzione *ad hoc* di un dispositivo microfluidico, creato per le analisi FTIR.

Il nostro studio dimostra inoltre che i risultati possono essere parzialmente invalidati a causa di insidie e artefatti sperimentali, anche quando si usa un modello di stress ossidativo ben consolidato.

Abbiamo, infatti, osservato che la reazione del reagente di Fenton con il PBS, una soluzione che contiene fosfati usata come tampone durante la fissazione, forma precipitati; possiamo quindi ragionevolmente dire che l'uso del PBS nella preparazione dei campioni può causare effetti simili.

Questi precipitati sono stati identificati, con la spettroscopia XRF, come materiale composto da ossigeno e ferro che si localizza sulla superficie delle cellule nemesperiche. Questi precipitati formano, nello spettro infrarosso, un picco abbastanza largo a circa 1150-1000 cm^{-1} che va a sovrapporsi ad uno dei picchi dei fosfati, nella regione tipica del DNA.

Ciononostante le analisi ci hanno permesso di verificare che la FTIR è una tecnica idonea a valutare il danneggiamento degli spermatozoi, soprattutto se di tipo ossidativo.

I risultati di questo lavoro sono stati sottomessi alla rivista *Reproductive Toxicology*.

Infine per dimostrare che il danno indotto dal congelamento del liquido seminale può essere valutato con la spettroscopia vibrazionale abbiamo usato una tecnica convenzionale per valutare il danno al DNA, e cioè la colorazione con arancio di acridina. Dal confronto fra il danno da congelamento e il danno indotto da stress ossidativo è risultato che gli spermatozoi nella condizione ossidativa di Fenton 20% hanno una percentuale di danno all'acido nucleico simile agli spermatozoi congelati; quindi il danno al DNA causato dal congelamento è valutabile con la FTIR perché ricade nel *range* di danno già valutato nel primo esperimento.

Per ricerche future sarebbe interessante confrontare, sugli stessi campioni, la spettroscopia FTIR e l'arancio di acridina. A tal proposito sono previste nuove analisi presso Elettra, nel contesto di un *proposal* di attività che è stato recentemente accettato.

Concludendo, la spettroscopia ad infrarosso è una metodica valida per la ricerca biologica e medica e permette di ottenere informazioni dettagliate sulla composizione biochimica e sulla struttura delle molecole del campione; induce un surriscaldamento minimo e ciò la rende una tecnica ideale per l'analisi di cellule vive, com'è stato ampiamente dimostrato. Anche se sarà prima necessario superare alcune difficoltà tecniche (come ad esempio inibire in maniera temporanea la motilità degli spermatozoi durante le analisi) si può tranquillamente prospettare un ingresso non troppo lontano della microscopia FTIR nelle pratiche della PMA, sia per valutazioni della qualità seminale sia per valutazioni di danno da congelamento.

6. BIBLIOGRAFIA

1. *Ovarian tissue cryopreservation: a committee opinion.* Fertil Steril, 2014. **101**(5): p. 1237-43.
2. Society, A.C., *Cancer facts and figures 2015*, A.C. Society, Editor. 2015: Atlanta.
3. Peccatori, F.A., et al., *Fertility Preservation Methods in Breast Cancer.* Breast Care (Basel), 2012. **7**(3): p. 197-202.
4. Marder, W., et al., *Ovarian Damage During chemotherapy in Autoimmune Diseases: Broad Health Implications beyond Fertility.* Clin Med Insights Reprod Health, 2012. **2012**(6): p. 9-18.
5. Jadoul, P., et al., *Clinical and biologic evaluation of ovarian function in women treated by bone marrow transplantation for various indications during childhood or adolescence.* Fertil Steril, 2011. **96**(1): p. 126-133 e3.
6. Grynberg, M., et al., *Fertility preservation in Turner syndrome.* Fertility and Sterility, 2015. **105**(1): p. 13-19.
7. Rives, N., et al., *The feasibility of fertility preservation in adolescents with Klinefelter syndrome.* Hum Reprod, 2013. **28**(6): p. 1468-79.
8. Mortada, R. and T. Williams, *Metabolic Syndrome: Polycystic Ovary Syndrome.* FP Essent, 2015. **435**: p. 30-42.
9. Carrillo, L., et al., *The role of fertility preservation in patients with endometriosis.* J Assist Reprod Genet, 2016.
10. Angioni, S., et al., *Surgical technique of endometrioma excision impacts on the ovarian reserve. Single-port access laparoscopy versus multiport access laparoscopy: a case control study.* Gynecol Endocrinol, 2015. **31**(6): p. 454-7.
11. Reyes, J.G., et al., *The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology.* Oxid Med Cell Longev, 2012. **2012**: p. 929285.
12. Lambertini, M., et al., *Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting.* BMC Med, 2016. **14**(1): p. 1.
13. Gosden, R., *Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation.* Fertil Steril, 2011. **96**(2): p. 264-8.
14. Baust, J.G., D. Gao, and J.M. Baust, *Cryopreservation: An emerging paradigm change.* Organogenesis, 2009. **5**(3): p. 90-6.
15. Amorim, C.A., et al., *Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue.* Reprod Biomed Online, 2011. **23**(2): p. 160-86.
16. Kopeika, J., A. Thornhill, and Y. Khalaf, *The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence.* Hum Reprod Update, 2015. **21**(2): p. 209-27.
17. Mazur, P., S.P. Leibo, and E.H. Chu, *A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells.* Exp Cell Res, 1972. **71**(2): p. 345-55.
18. R. Fabbri, P.C., B. Di Tommaso et al., *Tecniche di crioconservazione riproduttiva.* Rivista Italiana di Ostetricia e Ginecologia, 2004. **3**: p. 33-41.
19. Mazur, P., *Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing.* J Gen Physiol, 1963. **47**: p. 347-69.
20. Woods, E.J., et al., *Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues.* Cryobiology, 2004. **48**(2): p. 146-56.
21. Saragusty, J. and A. Arav, *Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification.* Reproduction, 2011. **141**(1): p. 1-19.

22. Santos, R.R., et al., *Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds*. Anim Reprod Sci, 2010. **122**(3-4): p. 151-63.
23. Donnez, J., Kim S., *Principles and Practice of Fertility Preservation*. 2011.
24. Bielanski, A., et al., *Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen*. Cryobiology, 2000. **40**(2): p. 110-6.
25. Parmegiani, L., et al., *Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos*. Fertil Steril, 2010. **94**(4): p. 1525-8.
26. Gonzalez, C., et al., *Concise review: fertility preservation: an update*. Stem Cells Transl Med, 2012. **1**(9): p. 668-72.
27. Balaban, B., D. Sakkas, and D.K. Gardner, *Laboratory procedures for human in vitro fertilization*. Semin Reprod Med, 2014. **32**(4): p. 272-82.
28. Fabbri R., M.V., Parazza I., Vicenti R., Macciocca M., Venturosi S., *Crioconservazione e preservazione della fertilità femminile: aspetti biologici*, in *Strategie terapeutiche dell'infertilità*, M.d.S.-. Italia, Editor. 2012.
29. Rodriguez-Wallberg, K.A. and K. Oktay, *Recent advances in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2012. **26**(3): p. 391-405.
30. Gamzatova, Z., et al., *Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue--effective method of fertility preservation in cancer patients*. Gynecol Endocrinol, 2014. **30 Suppl 1**: p. 43-7.
31. Mahajan, N., *Fertility preservation in female cancer patients: An overview*. J Hum Reprod Sci, 2015. **8**(1): p. 3-13.
32. Sanfilippo, S., et al., *Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing*. Reprod Biol Endocrinol, 2015. **13**: p. 67.
33. Stern, C.J., et al., *First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy*. Hum Reprod, 2013. **28**(11): p. 2996-9.
34. Johnson, J. and P. Patrizio, *Ovarian cryopreservation strategies and the fine control of ovarian follicle development in vitro*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1221**: p. 40-6.
35. Prasath, E.B., et al., *First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient*. Hum Reprod, 2014. **29**(2): p. 276-8.
36. Gandolfi, F., et al., *Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models*. Fertil Steril, 2006. **85 Suppl 1**: p. 1150-6.
37. Isachenko, V., et al., *Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of rapid and conventional freezing*. Cryobiology, 2007. **55**(3): p. 261-8.
38. Fabbri, R., et al., *Optimization of protocols for human ovarian tissue cryopreservation with sucrose, 1,2-propanediol and human serum*. Reprod Biomed Online, 2010. **21**(6): p. 819-28.
39. Li, Y.B., et al., *Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues*. Chin Med J (Engl), 2007. **120**(2): p. 110-4.
40. Keros, V., et al., *Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue*. Hum Reprod, 2009. **24**(7): p. 1670-83.
41. Suzuki, N., et al., *Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency*. Hum Reprod, 2015. **30**(3): p. 608-15.
42. Rosendahl, M., T. Greve, and C.Y. Andersen, *The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: a review of the literature*. J Assist Reprod Genet, 2013. **30**(1): p. 11-24.

43. Cortvrindt, R., J. Smits, and A.C. Van Steirteghem, *A morphological and functional study of the effect of slow freezing followed by complete in-vitro maturation of primary mouse ovarian follicles*. Hum Reprod, 1996. **11**(12): p. 2648-55.
44. Oktay, K., et al., *Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology?* Fertil Steril, 1998. **69**(1): p. 1-7.
45. Fabbri, R., et al., *Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen-thawed human ovarian tissue from oncologic patients*. Fertil Steril, 2014. **101**(3): p. 795-804.
46. Fabbri, R., et al., *Good preservation of stromal cells and no apoptosis in human ovarian tissue after vitrification*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 673537.
47. Sheikhi, M., et al., *Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue*. Hum Reprod, 2011. **26**(3): p. 594-603.
48. Talevi, R., et al., *Replacement of sodium with choline in slow-cooling media improves human ovarian tissue cryopreservation*. Reprod Biomed Online, 2013. **27**(4): p. 381-9.
49. Ortega R, D.G.a.C.A., *Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray microspectroscopy*. J R Soc Interface, 2009. **6**(5): p. 649-658.
50. Kaulich, B., et al., *Low-energy X-ray fluorescence microscopy opening new opportunities for bio-related research*. J R Soc Interface, 2009. **6 Suppl 5**: p. S641-7.
51. Gigante G, D.M., *La tecnica della fluorescenza a raggi X*, in *Metodologie fisiche non distruttive per le indagini sui Beni Culturali*, C.d.U.d.S.d.R.L. Sapienza', Editor. 2005.
52. Kaulich B, B.D., Susini J, David C, *A European Twin X-ray Microscopy Station Commissioned at ELETTRA.*, in *8th Int. Conf. X-ray Microscopy*, Y.K. S. Aoki, Y. Suzuki, Editor. 2006. p. 22-25.
53. www.elettra.trieste.it.
54. Pascolo, L., et al., *Synchrotron soft X-ray imaging and fluorescence microscopy reveal novel features of asbestos body morphology and composition in human lung tissues*. Part Fibre Toxicol, 2011. **8**(1): p. 7.
55. www.esrf.com.
56. Sven A. E. Johansson, J.L.C., Klas G. Malmqvist *Particle-Induced X-ray Emission Spectrometry (PIXE)*. 1995. 451.
57. Di Santo, M., et al., *Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART*. Adv Urol, 2012. **2012**: p. 854837.
58. Stahl, P.J., et al., *Indications and strategies for fertility preservation in men*. Clin Obstet Gynecol, 2010. **53**(4): p. 815-27.
59. Picton, H.M., et al., *A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys/dagger*. Hum Reprod, 2015. **30**(11): p. 2463-75.
60. Watson, P.F., *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. Anim Reprod Sci, 2000. **60-61**: p. 481-92.
61. Said, T.M., A. Gaglani, and A. Agarwal, *Implication of apoptosis in sperm cryoinjury*. Reprod Biomed Online, 2010. **21**(4): p. 456-62.
62. O'Connell, M., N. McClure, and S.E. Lewis, *The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function*. Hum Reprod, 2002. **17**(3): p. 704-9.
63. Kalthur, G., et al., *Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia*. Fertil Steril, 2008. **89**(6): p. 1723-7.
64. Zribi, N., et al., *Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity*. Fertil Steril, 2010. **93**(1): p. 159-66.
65. Meamar, M., et al., *Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from Opuntia ficus-indica*. Fertil Steril, 2012. **98**(2): p. 326-33.

66. Kadirvel, G., S. Kumar, and A. Kumaresan, *Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen*. Anim Reprod Sci, 2009. **114**(1-3): p. 125-34.
67. Kalthur, G., et al., *Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage*. Fertil Steril, 2011. **95**(3): p. 1149-51.
68. Johnston, S.D., et al., *Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function*. Reproduction, 2012. **143**(6): p. 787-97.
69. World Health Organization, D.o.R.H.a.R., *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, ed. Fifth. 2010.
70. Keel B.A., W.B.W., Roberts D.K, *Semen cryopreservation methodology and results*, in *Donor insemination*, C.I.D. Barratt C.L.R., Editor. 1993.
71. Bungum, M., *Sperm DNA integrity assessment: a new tool in diagnosis and treatment of fertility*. Obstet Gynecol Int, 2012. **2012**: p. 531042.
72. Shamsi, M.B., S.N. Imam, and R. Dada, *Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility*. J Assist Reprod Genet, 2011. **28**(11): p. 1073-85.
73. Schulte, R.T., et al., *Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes*. J Assist Reprod Genet, 2010. **27**(1): p. 3-12.
74. Gorczyca, W., J. Gong, and Z. Darzynkiewicz, *Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays*. Cancer Res, 1993. **53**(8): p. 1945-51.
75. David K. Gardner, A.W., Colin M. Howles, Zeev Shoham, *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*, ed. F. edition.
76. Sanchez, V., et al., *Oxidative DNA damage in human sperm can be detected by Raman microspectroscopy*. Fertil Steril, 2012. **98**(5): p. 1124-9 e1-3.
77. Griffiths, P.R., ed. *Introduction to vibrational spectroscopy Theory and Instrumentation*. 2006.
78. Napoli A, P.C., Vinciguerra V., *Principi di analisi spettroscopica con applicazioni ai beni culturali*. 2010: Aracne.
79. D'Amico, F., et al., *Oxidative damage in DNA bases revealed by UV resonant Raman spectroscopy*. Analyst, 2015. **140**(5): p. 1477-85.
80. Mallidis, C., et al., *Raman microspectroscopy: shining a new light on reproductive medicine*. Hum Reprod Update, 2014. **20**(3): p. 403-14.
81. Vongsvivut, J., et al., *Synchrotron-FTIR microspectroscopy enables the distinction of lipid accumulation in thraustochytrid strains through analysis of individual live cells*. Protist, 2015. **166**(1): p. 106-21.
82. Mattson, E.C., et al., *Opportunities for live cell FT-infrared imaging: macromolecule identification with 2D and 3D localization*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(11): p. 22753-81.
83. Mitri, E., et al., *Time-resolved FT-IR microspectroscopy of protein aggregation induced by heat-shock in live cells*. Anal Chem, 2015. **87**(7): p. 3670-7.
84. Gougeon, A., *Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results*. Hum Reprod, 1986. **1**(2): p. 81-7.
85. Pascolo, L., et al., *The interaction of asbestos and iron in lung tissue revealed by synchrotron-based scanning X-ray microscopy*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 1123.
86. Sole, A., Papillon, E., Cotte, M., Walter, P. & Susini, J, *A multiplatform code for the analysis of energy dispersive X-ray fluorescence spectra*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2007. **62**: p. 63-68.

87. Vaccari, L., et al., *Infrared microspectroscopy of live cells in microfluidic devices (MD-IRMS): toward a powerful label-free cell-based assay*. *Anal Chem*, 2012. **84**(11): p. 4768-75.
88. Kaulich B, T.P., Gianoncelli A. and Kiskinova M., *Transmission and emission x-ray microscopy: operation modes, contrast mechanisms and applications*. *JOURNAL OF PHYSICS: CONDENSED MATTER*, 2011. **23**.
89. Gianoncelli, A., Kourousias, G., Stolfa, A. & Kaulich, B., *Recent developments at the TwinMic beamline at ELETTRA: an 8 SDD detector setup for low energy X-ray Fluorescence*, in *J. Phys. Conf. Ser.* 2013. p. 182001.
90. Tejada, R.I., et al., *A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence*. *Fertil Steril*, 1984. **42**(1): p. 87-91.
91. Telli, O., et al., *Does varicocele affect DNA fragmentation in infertile patients?* *Indian Journal of Urology : IJU : Journal of the Urological Society of India*, 2015. **31**(2): p. 116-119.
92. Herraiz, S., et al., *Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices*. *Fertil Steril*, 2014. **101**(3): p. 775-84.
93. Schmidt, K.L., et al., *Density and distribution of primordial follicles in single pieces of cortex from 21 patients and in individual pieces of cortex from three entire human ovaries*. *Hum Reprod*, 2003. **18**(6): p. 1158-64.
94. Zhang, J.M., et al., *Comparisons of different protocols for vitrifying mouse ovarian tissue*. *Reprod Domest Anim*, 2010. **45**(4): p. 694-8.
95. Newton, H., et al., *Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue*. *Hum Reprod*, 1996. **11**(7): p. 1487-91.
96. Hovatta, O., et al., *Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants*. *Hum Reprod*, 1996. **11**(6): p. 1268-72.
97. Stachecki, J.J., J. Cohen, and S.M. Willadsen, *Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium*. *Cryobiology*, 1998. **37**(4): p. 346-54.
98. Merdassi, G., et al., *Examination of viability and quality of ovarian tissue after cryopreservation using simple laboratory methods in ewe*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011. **9**: p. 78.
99. Huang, L., et al., *Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008. **139**(2): p. 193-8.
100. Fahy, G.M., et al., *Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity*. *Cryobiology*, 2004. **48**(1): p. 22-35.
101. Sugiura, K., F.L. Pendola, and J.J. Eppig, *Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism*. *Developmental Biology*, 2005. **279**(1): p. 20-30.
102. Matthew N. Levy, B.M.K., Bruce A. , *Principi di fisiologia di Berne e Levy*, ed. Stanton.
103. Watson, L.N., et al., *Heparan sulfate proteoglycans regulate responses to oocyte paracrine signals in ovarian follicle morphogenesis*. *Endocrinology*, 2012. **153**(9): p. 4544-55.
104. Romanato, M., et al., *The presence of heparan sulfate in the mammalian oocyte provides a clue to human sperm nuclear decondensation in vivo*. *Hum Reprod*, 2008. **23**(5): p. 1145-50.
105. Whelan, D.R., et al., *Monitoring the reversible B to A-like transition of DNA in eukaryotic cells using Fourier transform infrared spectroscopy*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(13): p. 5439-48.
106. Mello, M.L. and B.C. Vidal, *Changes in the infrared microspectroscopic characteristics of DNA caused by cationic elements, different base richness and single-stranded form*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e43169.

107. Huacuja, L., et al., *Differences in lipoprotein composition between heads and tails of human sperm: an infrared spectroscopy study*. Arch Androl, 1990. **24**(1): p. 17-27.
108. Barcot, O., et al., *Investigation of spermatozoa and seminal plasma by fourier transform infrared spectroscopy*. Appl Spectrosc, 2007. **61**(3): p. 309-13.
109. Boerke, A., S.J. Dieleman, and B.M. Gadella, *A possible role for sperm RNA in early embryo development*. Theriogenology, 2007. **68 Suppl 1**: p. S147-55.
110. Heinz Fabian, M.J., Leigh Murphy, Peter H. Watson, Iduna Fichtner and Henry H. Mantsch, *A comparative infrared spectroscopic study of human breast tumors and breast tumor cell xenografts*. Biospectroscopy, 1995. **1**(1): p. 37-45.
111. S., T.R., *Infrared spectroscopy of carbohydrates: a review of the literature*. UNT Digital Library, 1968.
112. Aitken, R.J., et al., *Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation*. Asian J Androl, 2007. **9**(4): p. 554-64.
113. Miller, G.L., *Improved infrared photography for electrophoresis*. Science, 1952. **116**(3025): p. 687-8.
114. F. A. Miller, C.H.W., *Infrared Spectra and Characteristic Frequencies of Inorganic Ions*. Anal Chem, 1952. **28** (8): p. 1253-1294.
115. Mohammed, E.E., et al., *Acridine Orange and Flow Cytometry: Which Is Better to Measure the Effect of Varicocele on Sperm DNA Integrity?* Adv Urol, 2015. **2015**: p. 814150.
116. Petyim, S. and R. Choavaratana, *Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test*. J Med Assoc Thai, 2006. **89**(3): p. 306-13.
117. Aitken, R.J., et al., *Oxidative stress and male reproductive health*. Asian J Androl, 2014. **16**(1): p. 31-8.
118. Zhang, Y., J.C. Trussell, and K.R. Chohan, *Detecting and minimizing sperm DNA damage*. Semin Reprod Med, 2013. **31**(4): p. 267-73.
119. Ting, A.Y., et al., *Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system*. Hum Reprod, 2013. **28**(5): p. 1267-79.
120. Hreinsson, J., et al., *Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions*. Hum Reprod, 2003. **18**(11): p. 2420-8.