



Società Italiana di Embryo Transfer

Notiziario Marzo 2007

Cari colleghi,
è per me un grande onore scrivervi in qualità di presidente Siet.
Il mio primo pensiero va all'assemblea che durante l'ultimo congresso svoltosi in Valtellina ha votato il nuovo consiglio e al consiglio che mi ha voluto come presidente. Un saluto sentito va al past-president, Dr. Luigi Silvestrelli, che ci ha guidati in modo egregio durante i 3 anni appena trascorsi. Con lui siamo riusciti a organizzare i congressi di Assisi, Gallio e Mantello, con relatori di fama internazionale (ricordo tra gli altri Gregg Adams e Reuben Mapletoft) dove abbiamo trattato argomenti topici sia per chi opera direttamente nell'ET sia per il veterinario buiatra che si occupa di riproduzione; avevo partecipato a congressi di tale livello solo oltre oceano...
Il Prossimo congresso si terrà a Pisa il 12 e 13 di ottobre presso l'Università di Medicina Veterinaria: l'argomento principale sarà la vitrificazione. Grazie a Raffaele Boni avremo la fortuna di avere anche per questa occasione un ospite di chiara fama internazionale, prof Gabor Vajta, che da anni si occupa di questa tecnica, già diffusa fra i colleghi che praticano l' ET nei cavalli, tutta da scoprire per noi buiatri.
Il congresso di Pisa è il primo passo verso un' apertura della società anche a veterinari che si occupano di altre specie, in modo particolare cavalli ed ovi-caprini infatti sono in corso contatti molto costruttivi con i colleghi della Sire e con un gruppo di colleghi che si occupano di ET negli ovi-caprini, capitanati dal Dr. Luca Alunni, già

autore di un pregevole lavoro portato al congresso Siet di Assisi.
Ci sarà inoltre una tavola rotonda dal titolo "Dalla Valutazione della ricevente al trapianto", che spero porti ad un confronto costruttivo e pratico: è importante che ogni collega metta a disposizione la sua esperienza con l'obiettivo di una crescita culturale costante.
La cosa che più mi ha impressionato partecipando ai congressi americani e canadesi è stata una sessione chiamata da loro ET101: ogni anno un leader di un gruppo illustra la sua metodica di lavoro e i suoi risultati sono supportati da una raccolta dati molto dettagliata, da qui si apre la discussione, tutti si mettono in gioco senza timore...così la tecnica cresce ed i risultati arrivano!
Voglio infine fare una considerazione ed un augurio: in Italia facciamo poco più di 1000 flushing all'anno, in Francia 6000, in Germania e Olanda 2700, per non parlare di Canada e America; spero che la Siet sia un punto fermo per un aggiornamento costante e qualitativamente sempre più elevato, che la tecnica si diffonda attraverso veterinari preparati, creando lavoro economicamente e professionalmente gratificante.

Pierluigi Guarneri

ELEMENTI DI “CRIO-EMBRIOLOGIA”

Francesco Silvestre

Stazione Zoologica “Anton Dohrn”, Napoli

La crioconservazione consente la preservazione di cellule e tessuti dai danni del tempo mediante l'esposizione a basse temperature. Ciò comporta la sospensione delle reazioni metaboliche conseguente al congelamento dell'acqua libera. Tale condizione prevede cambiamenti fisici considerevoli (congelamento e scongelamento) che possono, tuttavia, risultare essi stessi dannosi alla sopravvivenza cellulare. L'individuazione dei meccanismi responsabili del danno cellulare è estremamente difficile; ciò a causa delle complesse proprietà delle cellule e dell'incapacità di discriminare gli effetti dei diversi fattori durante la crioconservazione.

La formazione di ghiaccio extracellulare gioca un ruolo rilevante nella dinamica dei danni biofisici arrecati dal processo di crioconservazione, poiché altera le caratteristiche chimico-fisiche delle cellule e prelude alla formazione di ghiaccio all'interno delle stesse. Poiché la soluzione extracellulare diviene sempre più concentrata in soluti all'aumentare della quota di acqua libera cristallizzata, ne deriva un potenziale squilibrio chimico tra il citosol e la soluzione esterna non congelata. Ciò si traduce in un aumento della pressione osmotica extracellulare con conseguente disidratazione cellulare. L'acqua intracellulare, raffreddata durante il congelamento, può raggiungere l'equilibrio termodinamico in due modi: o abbandonando la cellula e formando ghiaccio extracellulare, oppure formando ghiaccio all'interno della cellula. Durante la crioconservazione, il destino dell'acqua cellulare dipende dalla sua velocità di diffusione transmembrana e da quella di formazione dei nuclei di cristallizzazione. Quando le cellule sono congelate lentamente, il tasso di efflusso dell'acqua è sufficientemente elevato da prevenire livelli eccessivi di congelamento e, perciò, la disidratazione cellulare precede la formazione di ghiaccio intracellulare. Viceversa, a velocità rapide di congelamento, l'esosmosi di acqua è lenta, e, così, la formazione di ghiaccio intracellulare prevale. Generalmente, si ritiene che il danno cellulare derivi da forze meccaniche prodotte dal ghiaccio intracellulare, e che i siti maggiormente danneggiati siano la membrana plasmatica e quella degli organelli intracellulari. Allo scopo di contrastare tali modificazioni risulta, quindi, necessario l'ausilio dei crioprotettori.

CRIOPROTETTORI

Con tale denominazione vengono accomunate sostanze diverse capaci di proteggere le cellule dai danni derivanti dal processo di crioconservazione.

Nella messa a punto di un protocollo di crioconservazione è importante la scelta del tipo e la concentrazione del crioprotettore da impiegare. Parametri quali velocità di diffusione e tossicità variano sensibilmente in funzione del tipo cellulare e della specie animale. In pratica, bisogna raggiungere un rapporto tossicità-protezione tale che la cellula sia protetta dai danni del freddo e, contemporaneamente, tolleri la tossicità del crioprotettore; tuttavia, bisogna precisare che la tossicità di un crioprotettore è dovuta alle sue caratteristiche chimiche (come ad es. capacità di denaturare gli enzimi), al tempo di esposizione e alla temperatura alla quale è sottoposto il sistema.

In base alla capacità di oltrepassare o meno la membrana plasmatica, i crioprotettori possono essere distinti in:

- *PERMEANTI* (CPA= Cryoprotective Permeating Agents): si tratta di molecole di piccole dimensioni che, diffondendo attraverso la membrana plasmatica e, superando la differenza di pressione osmotica esistente tra i 2 lati della membrana plasmatica, consentono di abbassare la temperatura alla quale si formano i cristalli di ghiaccio riducendone la formazione; le sostanze più comunemente usate sono: il dimetilsolfossido (DMSO), il glicerolo (Gly), il propilenglicole (PG) e l'etilenglicole (EG).
- *NON PERMEANTI* : sono molecole che non penetrando attraverso la membrana plasmatica producono una condizione di disidratazione cellulare con conseguente riduzione della formazione di ghiaccio durante il congelamento. I più comuni sono glucosio, saccarosio, polivinilpirrolidone (PVP), trealosio, ecc.

Prima di procedere al congelamento, è necessario esporre le cellule ai crioprotettori per un tempo variabile; tale fase è detta di “equilibrio” o “adattamento”. Durante tale periodo il crioprotettore si scambia con o sottrae l'acqua intracellulare con una velocità variabile in funzione di parametri quali: temperatura, specie, tipo cellulare, concentrazione e tipo di crioprotettore e tempo di esposizione. Tali parametri risultano fortemente interdipendenti.

La temperatura di esposizione condiziona sensibilmente la permeabilità ai diversi crioprotettori e da quest'ultima dipenderà la loro tossicità. Sulla base di

Notiziario SIET - Aprile 2007

sede sociale : c/o Faver, Via Belgio 10, 37135 Verona

http://www.unibas.it/centri/siet/Home_Page.htm

siet@unibas.it

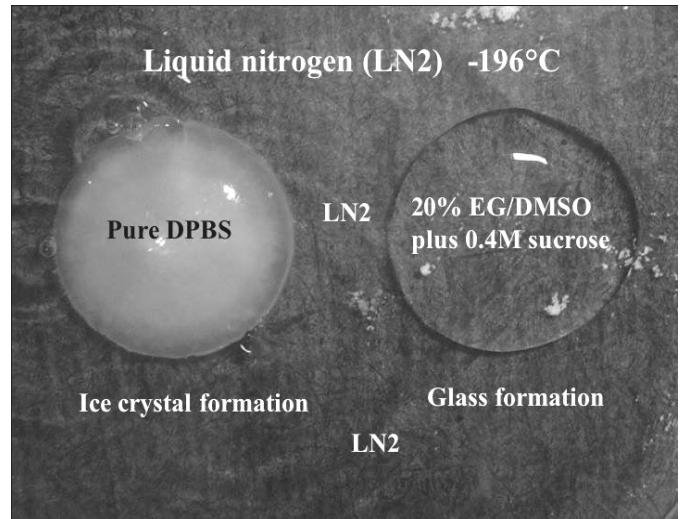
tale assunto è possibile ottenere una riduzione della tossicità mediante riduzione della temperatura di esposizione del campione.

Il tempo di esposizione deve essere calibrato in maniera ottimale poiché, se troppo breve, non consente un'adeguata penetrazione del crioprotettore, ma se troppo lungo, produce danneggiamento dell'embrione.

Le membrane della maggior parte delle cellule, ovociti compresi, sono più permeabili all'acqua che ai CPA; perciò, quando si trattano ovociti/embrioni con CPA, inizialmente essi raggrinziscono poiché l'acqua fuoriesce più rapidamente di quanto entri il CPA, e, poi, si rigonfiano col penetrare nella cellula del CPA fino al raggiungimento di un punto di equilibrio. Per la stessa ragione, allo scongelamento, allorché il CPA viene rimosso, le cellule si rigonfiano per ritornare al loro volume iniziale allorché il CPA è completamente allontanato dal comparto intracellulare. I cambiamenti volumetrici causati dall'aggiunta e dalla rimozione del CPA possono essere dannosi se oltrepassano i limiti di tolleranza osmotica della cellula. Nella pratica, questi cambiamenti sono minimizzati mediante l'aggiunta o la rimozione del CPA in passaggi graduali (steps) oppure mediante la presenza di un crioprotettore non permeante, come il saccarosio.

La presenza di questi composti in una soluzione acquosa riduce il fenomeno della cristallizzazione e abbassa il Δt crioscopico. Alte concentrazioni di tali sostanze possono, inoltre, generare un cambiamento di stato della soluzione quando sottoposta a basse temperature (da liquido a vitreo ed ecco perché si parla di vitrificazione), senza consentire la cristallizzazione e, quindi, la formazione di ghiaccio che gli conferirebbe un colore opalescente (vedi Figura). Purtroppo, molti composti sono troppo tossici per essere efficientemente utilizzati in criobiologia, soprattutto ad elevate concentrazioni. Le sostanze più utilizzate sono alcuni glicoli (etilenglicole, propandiololo, glicerolo) e il DMSO. Tali sostanze sono dotate di elevata volatilità, condizione che rende le soluzioni congelanti non stabili ed il loro impiego limitato nel tempo.

E' di fondamentale importanza valutare attentamente la composizione di una soluzione, i tempi di equilibrio e la temperatura, tutto in funzione delle caratteristiche di permeabilità e sensibilità del tipo cellulare in esame.



PROCEDURE DI CRIOCONSERVAZIONE

Ci sono due approcci di base alla criopreservazione di cellule e tessuti: le procedure di congelamento/scongelamento e la vitrificazione. Le tecniche di congelamento/scongelamento comportano la formazione di ghiaccio nella soluzione extracellulare, mentre, in condizioni operative opportune, viene resa minima la probabilità che si formi ghiaccio intracellulare. Le procedure di vitrificazione, invece, escludono la formazione di ghiaccio in ogni parte del campione.

Le tecniche di congelamento prevedono il ricorso a fasi di equilibrio (congelamento lento) o di non equilibrio (congelamento rapido), con curve di discesa termica variabili tra 0,3 e 1°C/min (nel range che va da -6 a -35°C) e di >10°C/min (fino a -196°C) per quello lento, mentre per quello rapido si utilizzano curve di discesa termica comprese tra 200 e i 2000°C/min.

CONGELAMENTO LENTO

Le procedure di congelamento lento e rapido differiscono sia nelle concentrazioni di crioprotettori usate e nelle curve di discesa termica applicate così come nelle modalità e tempistica delle metodiche utilizzate. Le procedure di congelamento lento utilizzano di solito soluzioni contenenti crioprotettori a concentrazioni di 1-2 mol/l e sono in grado di ridurre la probabilità di formazione del ghiaccio intracellulare con un abbassamento del Δt crioscopico a temperature comprese tra -6 e -7 °C.

La velocità di congelamento adottata condiziona la dinamica di sviluppo del ghiaccio extracellulare. I migliori risultati si ottengono applicando curve di discesa termica rapide, con le quali si ottiene un

equilibrio tra la perdita di acqua da parte della cellula e la formazione di cristalli di ghiaccio extracellulare. La curva di discesa termica generalmente applicata per ovociti ed embrioni (tra 0,3 e 1°C/min) dipende dalle caratteristiche fisiche, soprattutto dimensioni e permeabilità di tali cellule, ed è sensibilmente più lenta di quella utilizzata per le cellule somatiche e spermatozoi (da 1 a >100°C/min).

I protocolli di congelamento lento utilizzano concentrazioni relativamente basse di crioprotettori; purtuttavia, allo scopo di limitare i danni causati dalla tossicità di tali sostanze e dagli shock osmotici legati alla loro esposizione/rimozione è importante una oculata scelta del crioprotettore, del numero di steps, del tempo e della temperatura di esposizione e rimozione.

Fino ad ora, un numero limitato di procedure di congelamento lento è stato testato su embrioni a vari stadi di sviluppo, ottenendo tassi di sopravvivenza variabili. Gli ovociti e embrioni di topo sono particolarmente resistenti alla crioconservazione in virtù delle loro piccole dimensioni, della loro resistenza al freddo e della ridotta formazione di nuclei di ghiaccio intracellulare. Ovociti ed embrioni di animali di interesse zootecnico, come bovini, equini e suini sono, invece, molto più sensibili al freddo. I principali svantaggi del congelamento lento sono rappresentati dal costo elevato di acquisto e mantenimento dell'attrezzatura (congelatore automatizzato) e dal lungo tempo (più di 1 ora) necessario per lo svolgimento di tali procedure.

CONGELAMENTO RAPIDO

Le procedure di congelamento rapido iniziarono a svilupparsi intorno agli anni '70 e sono definite procedure di non equilibrio, poiché non viene raggiunto un equilibrio con la soluzione congelante, contrariamente a quanto accade per il congelamento lento. Gli studi in merito hanno testato un'ampia gamma di diverse velocità di raffreddamento, di riscaldamento, di contenitori e crioprotettori.

Generalmente, i protocolli rapidi differiscono da quelli lenti per la maggiore disidratazione, per una più alta concentrazione dei crioprotettori e per il singolo step con cui è attuato il raffreddamento, che abbatta la temperatura del campione portandola da alcuni gradi sopra lo zero fino a parecchi gradi al di sotto (< -130°C). Tali procedure non richiedono attrezzature specifiche, comportano un ridotto dispendio di azoto liquido, ed, infine, si effettuano in minor tempo. Esse sono, quindi, più economiche e facili da organizzare,

ma, allo stesso tempo, richiedono necessari accorgimenti in funzione del materiale biologico utilizzato. Le tecniche maggiormente utilizzate prevedono il raffreddamento del campione "a secco" (nella fase gassosa dell'azoto liquido) o nell'azoto liquido stesso, generando, così, una curva di discesa termica molto rapida e diversa in funzione del contenitore adottato: da 2000°C/min (paillette) fino a 20000°C/min (griglie da microscopia elettronica e paillette allungate: OPS).

I supporti descritti in letteratura sono vari:

- *paillette* (straw)
- *griglia per microscopio elettronico (copper grid)*
- *superficie solida (solid surface)* costituita da un blocco di acciaio parzialmente immerso in azoto liquido su cui vengono poste le microgocce di soluzione da congelare
- *foglio di alluminio* galleggiante in azoto liquido, sopra cui sono poste le microgocce di soluzione da congelare
- *OPS (Open Pulled Straw)*, paillette allungata con le caratteristiche di un capillare
- *cryoloop*, una sorta di micro-cappio con al centro un film di soluzione (modello: stick per bolle di sapone) il cui volume è ancora più ridotto di quello usato nei precedenti supporti, consentendo così un raffreddamento più veloce
- *cryotop*, una sorta di micro-spatolina all'estremità di una bacchetta che può essere chiusa all'interno di un cryovial.

Questi ultimi due supporti sono stati concepiti allo scopo di fornire garanzie igieniche non assicurate dai sistemi aperti su elencanti. Recentemente, tuttavia, anche il sistema OPS si è adeguato a tali condizioni. Negli ultimi anni, la tecnologia di congelamento rapido ha assunto un enorme interesse in campo umano per la necessità di crioconservazione delle ovocellule.

VITRIFICAZIONE

Le procedure di vitrificazione prevedono l'utilizzo degli stessi supporti descritti precedentemente, ma con concentrazioni di crioprotettore così elevate da rendere le soluzioni, sottoposte a temperature criogeniche, simili al vetro, senza formazione di cristalli di ghiaccio durante le fasi di raffreddamento, conservazione e riscaldamento. L'elevata tossicità delle soluzioni vitrificanti richiedono tempi di esposizione molto ridotti ed elevate velocità di discesa termica. Quest'ultima condizione viene raggiunta, in genere, riducendo il

volume del campione. Un'alternativa è offerta dalla riduzione della temperatura dell'azoto liquido mediante procedure fisiche (Vit-Master®). Una soluzione vitrificante potrebbe dar luogo alla formazione di cristalli di ghiaccio al variare delle condizioni operative. Cristalli possono, così, svilupparsi durante la fase di riscaldamento (devitrificazione) o anche durante il raffreddamento. A causa delle interazioni tra la formazione di ghiaccio e le condizioni di raffreddamento e riscaldamento, è possibile avere, contemporaneamente nella stessa soluzione, regioni vitrificate e ghiacciate. Una soluzione con composizione fissa, ma con raffreddamento e riscaldamento a velocità variabili, o, viceversa, con velocità costanti, ma con composizione diversa, può dare origine a tutta una serie di risultati: si può avere una soluzione del tutto trasparente (che è indice di assenza di ghiaccio e, quindi, è in uno stato vitreo), oppure, una soluzione leggermente opaca per la presenza di microcristalli di ghiaccio, oppure, una soluzione completamente opaca a causa di numerosi macrocristalli di ghiaccio. Anche le soluzioni trasparenti possono, tuttavia, contenere nuclei e cristalli di ghiaccio: essi diventano visibili solo quando saranno più larghi della lunghezza d'onda della luce. Un'attrezzatura sensibile, come il calorimetro a scansione differenziale, può misurare l'emissione e l'assorbimento di energia associato con la formazione e la fusione dei cristalli di ghiaccio. Se un campione non è raffreddato in modo uniforme o se una soluzione non è ben mescolata, può portare alla formazione di regioni vitrificate e non vitrificate.

Diversamente dalle soluzioni per il congelamento lento, che si espandono durante la fase di discesa termica, poiché il ghiaccio occupa un volume maggiore dell'acqua, le soluzioni vitrificanti presentano lo stesso volume della soluzione di partenza o, addirittura, minore. In assenza di ghiaccio, inoltre, non c'è nessun movimento di solventi e soluti durante il raffreddamento. In linea teorica, queste caratteristiche dovrebbero rendere la soluzione capace di rimanere allo stato vitreo per tutta la durata del raffreddamento e riscaldamento, con danni minori per le cellule rispetto alle procedure di congelamento. Onde evitare un'eccessiva tossicità ed un'eccessiva disidratazione per l'elevata concentrazione del CPA, è necessario aumentare la concentrazione di CPA gradualmente, in più passaggi, in modo tale che le cellule assumano una

quantità di crioprotettore sufficiente a proteggerle dai danni della disidratazione, senza avere, contemporaneamente, effetti tossici; inoltre, è importante che il tempo di esposizione alla soluzione finale di vitrificazione sia ridotto. Un'esposizione troppo breve, tuttavia, non consente una sufficiente penetrazione del crioprotettore, e, così, si può avere la formazione del ghiaccio intracellulare anche in assenza di quello extracellulare. Perciò, un tempo di esposizione ottimale per la vitrificazione rappresenta un compromesso necessario e vincolante per limitare la tossicità e la formazione del ghiaccio intracellulare.

Con il congelamento convenzionale più del 50% degli embrioni possono risultare danneggiati fisicamente. Con la vitrificazione l'incidenza di tali danni fisici è considerevolmente ridotta, probabilmente a causa dell'assenza di ghiaccio, nonostante il raffreddamento e riscaldamento rapidissimo.

In conclusione, la vitrificazione aspira ad essere la tecnica di crioconservazione più utilizzata nel futuro in quanto alternativa alle tecniche di conservazione lenta, ma competitiva per costi e tempi, offrendo nuove opportunità, come, ad esempio, l'applicazione a cellule in precedenza di difficile conservazione, come gli ovociti.

BIBLIOGRAFIA

1. Jain JK, Paulson RJ. *Fertil Steril.* 2006; 86 Suppl 4:1037-46.
2. Koutlaki N, Schoepper B, Maroulis G, Diedrich K, Al-Hasani S. *Reprod Biomed Online.* 2006;13:427-36.
3. Vajta G, Nagy ZP. *Reprod Biomed Online.* 2006;12:779-96.
4. Nawroth F, Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V, Liebermann M, Tucker MJ, Liebermann J. *Semin Reprod Med.* 2005; 23:325-35.
5. Vajta G, Kuwayama M. *Theriogenology.* 2006; 65:236-44.
6. Fuller B, Paynter S. *Reprod Biomed Online.* 2004;9:680-91.
7. Fuller BJ. *Cryo Letters* 2004; 25:375-88.

Programma preliminare
SIET 2007
Pisa, 12 e 13 ottobre 2007

Venerdì 12/10/07

- ore 8,30 iscrizione congresso
- ore 10,00 Congelamento embrionale. **G. Vajta**
- ore 11,30 Coffee break
- ore 12,00 Vittrificazione **G. Vajta**
- ore 13,00 Pausa Pranzo
- ore 14,30 Esperienze di vittrificazione dell'embrione equino. **L. Caracciolo di Brienza**
- ore 14,50 Qualità e selezione spermatica. **R Gualtieri**
- ore 15,10 Comunicazioni libere
- ore 16,00 Coffee break
- ore 16,30 Comunicazioni libere
- ore 18,00 Assemblea soci
- ore 20,30 Cena sociale

Sabato 13/10/07

- ore 9,00 Coltura embrionale in condizioni di campo **G. Vajta**
- ore 11,00 Coffee break
- ore 11,30 Tavola rotonda su: "Dalla valutazione della ricevente al trapianto" coordinata da **E Morvillo** intervengono **PL Guarneri, M Lora, R Landriscina**
- ore 13,00 Pausa Pranzo
- ore 14,30 Laboratorio sulle tecniche di crioconservazione. **G. Vajta**
- ore 17,00 Chiusura lavori



Comunicazione ai Soci

Il prossimo congresso della Associazione Europea di Embryo Transfer si svolgerà ad Alghero, il 7-8 Settembre 2007. La scadenza per la presentazione degli abstracts (da inviare a pat.lonergan@ucd.ie) è il 15 maggio 2007. Per maggiori informazioni consultare il sito AETE www.aete.eu

Notiziario SIET - Aprile 2007
sede sociale : c/o Faver, Via Belgio 10, 37135 Verona
http://www.unibas.it/centri/siet/Home_Page.htm
siet@unibas.it

Notiziario SIET - Aprile 2007
sede sociale : c/o Faver, Via Belgio 10, 37135 Verona
http://www.unibas.it/centri/siet/Home_Page.htm
siet@unibas.it