

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN: **SCIENZE BIOLOGICHE**

Titolo tesi: UN NUOVO APPROCCIO PER LA CRIOCONSERVAZIONE DELLO SPERMA UMANO CON AFPIII

A NOVEL APPROACH FOR HUMAN SPERM CRYOPRESERVATION WITH AFPIII

TESI DI LAUREA DI: ARIANNA SCANSANI

RELATRICE: FRANCESCA MARADONNA

Sessione autunnale
Anno accademico 2022-2023

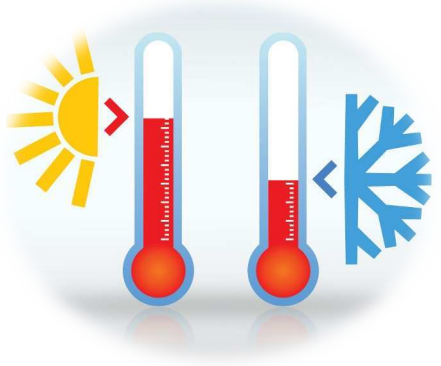
INTRODUZIONE

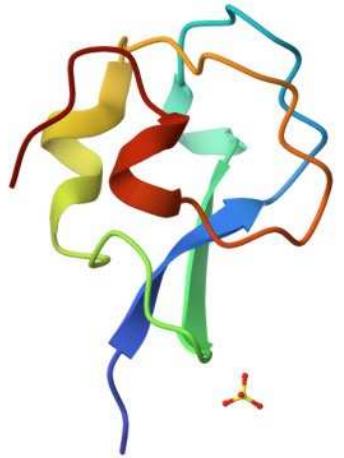
Crioconservazione dei gameti



Preservare la fertilità dei pazienti

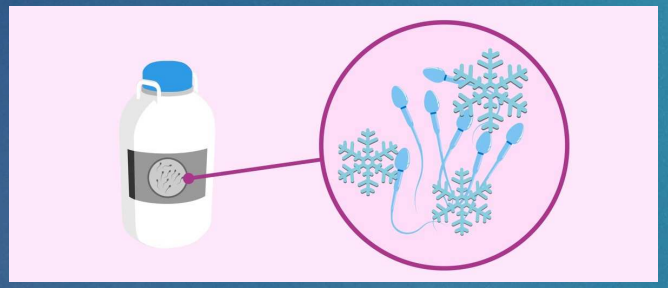
Shock termico, stress osmotico, formazione di cristalli di ghiaccio intra- ed extra-cellulari



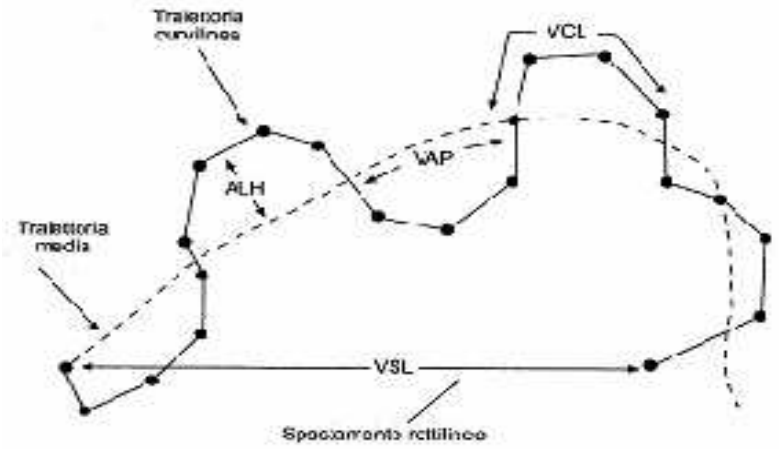


Utilizzo di AFPIII

MATERIALI E METODI



- **Raccolta** di 20 campioni di sperma → suddivisione in 7 aliquote:
  - 1 gruppo fresh (controllo fresco)
  - 6 gruppi esposti a diverse concentrazioni di AFPIII: 0 [controllo], 0.01, 0.1, 1, 5 e 10 µg/ml; processo di **congelamento** e **scongelamento**
- Analisi della **motilità** e della **velocità**



- Analisi della **vitalità**

MATERIALI E METODI



- Analisi dell'integrità di membrana (PMI) → test HOS

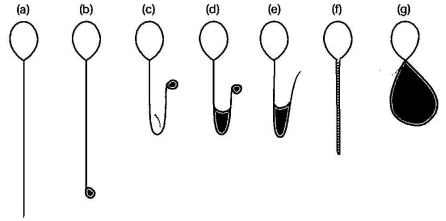


Figura 1: Rappresentazione di tipici rigonfiamento osservati negli spermatozoi umani sottoposti a stress ipo - osmotico (le aree più scure indicano le regioni rigonfie.

- Analisi della frammentazione del DNA (DFI) → test TUNEL

- Analisi delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

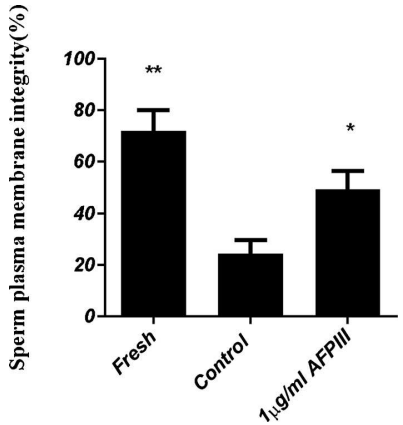
RISULTATI

Table 1
Sperm motion characteristics, sperm viability, and HOS test in control and different experimental groups. Data are expressed as mean percentage ± SD, (*P < 0.05, **p < 0.001).

samples	Total motility (%)	Progressive Motility (%)	Curve speed – VCL (μm/sec)	Linear speed - VSL (μm/sec)	Avg. value - VAP(μm/sec	Viability (%)	HOS test (%)
Fresh	66.8 ± 10.9**	56.29 ± 10.35**	100.14 ± 18.39**	51.68 ± 14.44**	68.52 ± 18.31**	83 ± 0.1**	79 ± 1.61**
Control (0 μg/ml AFPIII)	20.25 ± 10.9	16.88 ± 3.11	29.98 ± 5.48	15.5 ± 4.33	20.56 ± 5.49	29 ± 0.07	24 ± 1.74
0.01 μg/ml	23.07 ± 3.93	15.12 ± 2.71	26.98 ± 4.48	14.39 ± 3.83	19.75 ± 6.01	29 ± 0.07	25 ± 0.91
0.1 μg/ml	23.37 ± 3.82	14.07 ± 2.59	25.04 ± 4.83	12.56 ± 4.2	17.12 ± 4.2	25 ± 0.03	23 ± 1.64
1 μg/ml	29.35 ± 5.02*	28.11 ± 5.17*	49.53 ± 9.72*	24.67 ± 11.59*	34.27 ± 9.15*	38 ± 0.05*	35 ± 1. 32*
5 μg/ml	6.63 ± 3.36	6.53 ± 4.48	12.97 ± 2.73	5.78 ± 2.05	7.53 ± 2.31	15 ± 0.06	12 ± 2.81
10 μg/ml	6.63 ± 1.1	6.52 ± 3.93	10.6 ± 2.02	5.78 ± 1.43	7.53 ± 2.01	5 ± 0.01	4 ± 0.41

Valori più alti nel campione fresco, più bassi nei campioni congelati-scongelati, *ma* tra questi nel gruppo con **1 μg/ml di AFPIII** tutti i parametri valutati sono più elevati

RISULTATI



Valori in % di integrità di membrana

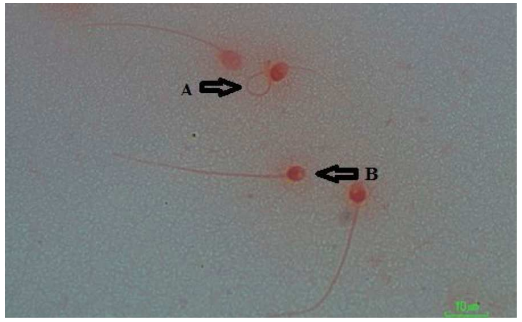
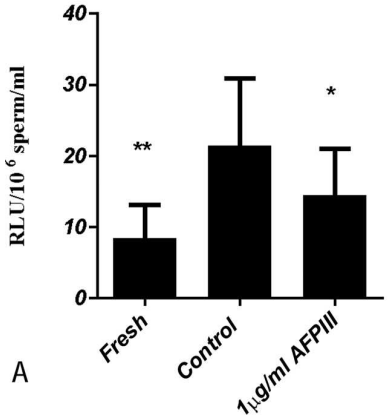
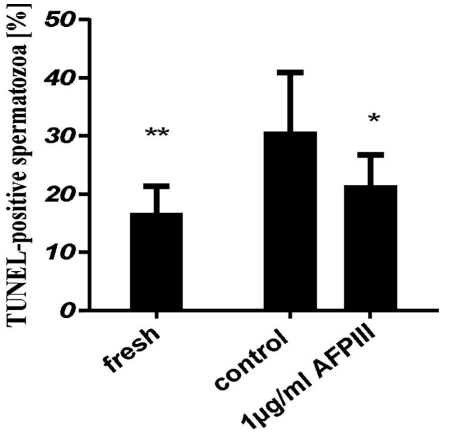


Fig. 1. Microscopic image showing sperm membrane integrity colored with hypo-osmotic swelling test (HOST); (A) plasma membrane integrity, and (B) plasma membrane un-integrity.



Livelli di ROS espressi in Relative Light Unit (RLU) per 10^6 spermatozoi



Valori in % di DNA frammentato

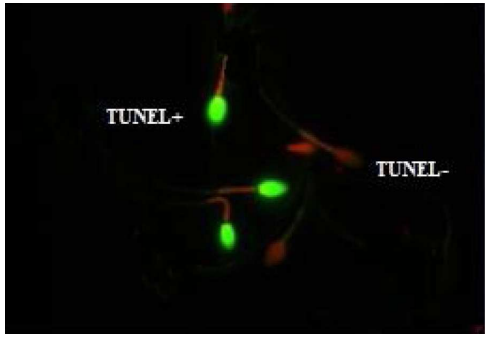


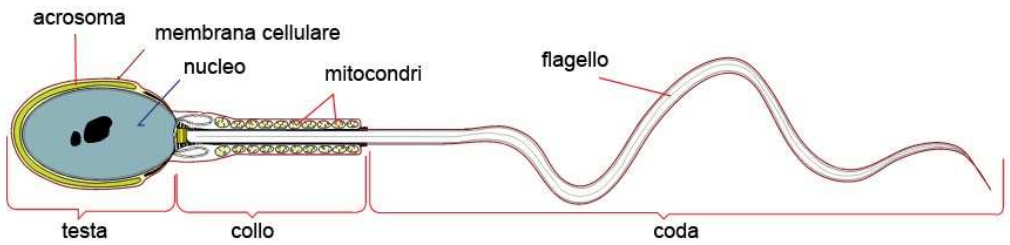
Fig. 2. Evaluation of DNA damage with TUNEL using a fluorescence microscope (Light green sperms indicate DNA damage (TUNEL+) and the red dots show normal DNA (TUNEL-) in the sperms).

CONCLUSIONE E DISCUSSIONE

In presenza di 1 µg/ml
di AFPIII:

Motilità, vitalità e
PMI preservati

ROS e DFI diminuiti



Danni maggiormente recati
alla membrana cellulare

utilizzo di GEYC

e al DNA per via dello stress
ossidativo causato dai ROS

utilizzo di 1 µg/ml di AFPIII



CONCLUSIONE E DISCUSSIONE

Limitazioni delle AFP

- Costose
- Difficili da isolare



Zoarces americanus

Miglioramenti possibili

- Produzione sintetica delle AFP
- Ulteriori studi con l'utilizzo di campioni umani



Abstract-Riassunto esteso

La crioconservazione dello sperma causa diversi stress tra cui lo shock termico, il danno osmotico e la formazione di cristalli di ghiaccio, riducendo così la qualità dello sperma. Pochi studi hanno valutato l'applicazione delle proteine AFP nella crioconservazione. Gli effetti della AntiFreeze Protein III (AFP III) nella crioconservazione dello sperma umano non sono del tutto chiari, quindi abbiamo condotto questo studio per scoprire le conseguenze del trattamento con AFPIII sui parametri dello sperma umano dopo la crioconservazione. Per prima cosa, sono stati valutati per 20 campioni di sperma gli effetti di varie concentrazioni di AFPIII (0, 0.01, 0.1, 1, 5, 10 µg/ml). I parametri dello sperma, come la motilità e la vitalità, sono stati stimati al fine di identificare una dose ottimale. Poi, i 20 campioni di sperma liquidi sono stati divisi in tre aliquote e diluiti in Glycerol-Egg-Yolk-Citrate (GEYC), un'aliquota conteneva sperma crioconservato senza AFPIII (controllo), un'altra la dose ottimale di AFPIII e una i gruppi freschi. Dopo lo scongelamento, i campioni sono stati valutati per l'integrità della membrana plasmatica (PMI), l'indice di frammentazione di DNA (DFI), le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e i livelli di capacità antiossidante totale (TAC). Il trattamento degli spermatozoi con 0.01, 0.1 e 1 µg/ml di AFPIII ha incrementato la motilità e la vitalità degli spermatozoi rispetto al gruppo di controllo, ma le concentrazioni più alte sono risultate inefficaci. In conclusione, i risultati hanno mostrato che l'aggiunta al GEYC di AFPIII a 1 µg/ml ha migliorato motilità, PMI, vitalità e TAC e ha diminuito ROS e frammentazione del DNA dello sperma umano crioconservato rispetto al gruppo di controllo.

Sitografia

- https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32279880/
- https://www.abanalitica.com/catalogo/files/803.pdf
- https://www.valorinormali.com/altri-esami/spermiogramma/#:~:text=per%20lo%20sperma.-,Liquefazione,ad%20un%20liquido%20più%20fluido
- https://www.cura-avanzata.it/esami-diagnostici/spermiogramma/#:~:text=Il%20processo%20di%20liquefazione%20dello,minuti%20potrebbe%20compromettere%20la%20fertilità
- https://veterinaria.uniss.it/sites/st04/files/scientific_school_le_tecniche_di_congelamento.pdf
- https://www.diagnosticageneticanutrizione.it/2018/01/12/specie-reattive-dellossigeno-ros-e-infertilita-maschile/
- https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11550043
- https://www.minitube.com/catalog/en/sbs-cryosystem-spectrum-p1608/
- https://www.unina.it/-/28536960-danno-ossidativo-al-dna-nuova-scoperta-della-federico-ii#:~:text=Lo%20stress%20ossidativo%2C%20a%20sua,suscettibile%20all%27azione%20dei%20ROS
- https://thesis.unipd.it/retrieve/3c0b23d5-ae89-4cd2-9275-95e18bbddd49/Boschetti_Matilde.pdf
- https://www.rcsb.org/structure/1HG7