

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

FACOLTA' DI LETTERE E FILOSOFIA

DIPARTIMENTO DI FILOSOFIA “A. ALIOTTA”



XXII CICLO DOTTORATO IN BIOETICA

**“BIOLOGIA E BIOETICA DELLA CRIOPRESERVAZIONE DI
OVOCITI E TESSUTO OVARICO NELL' UOMO”**

Tutor:

*Ch.ssim*o Professore
ROBERTO GUALTIERI

Candidato:

Dottoressa
MOLLO VALENTINA

Coordinatore:

*Ch.ssim*o Professore
GIUSEPPE LISSA

A NNO ACCADEMICO: 2006/2009

INDICE

	PAG
INDICE	1
PREMESSA	6
INTRODUZIONE	13
GLI ASPETTI GIURIDICI: LA LEGGE 40	14
ASPETTI CRITICI DELLA LEGGE N°40	15
-Il consenso e la sua revoca	15
-Condizione giuridica del nato	16
-Misura di tutela dell'embrione.....	17
L'INIZIO DELLA VITA E LO STATUTO DELL'EMBRIONE	18
INFERTILITA'.....	19
TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA	22
PRESERVAZIONE DELLA FERTILITA'	26
STRATEGIE PER PRESERVARE LA FERTILITA' NEL PAZIENTE ONCOLOGICO.....	31
- <i>Criopreservazione embrionale</i>	32
- <i>Criopreservazione ovocitaria</i>	33
- <i>Criopreservazione del tessuto ovarico</i>	36
- <i>Criopreservazione dei follicoli isolati</i>	37
LA CRIOPRESERVAZIONE	39
- <i>Congelamento lento</i>	39
- <i>Vitrificazione</i>	40
- <i>Scongelamento</i>	41
- <i>Criopreservazione con colina</i>	42
DALLA CRIOCONSERVAZIONE DEGLI EMBRIONI A QUELLA DEGLI OVOCITI	43
TRE "BUONE RAGIONI ITALIANE" PER CRIOCONSERVARE GLI OVOCITI.....	45

PARTE I

CRIOPRESERVAZIONE OVOCITARIA 48

PARTE II

CRIOPRESERVAZIONE DEL TESSUTO OVARICO 63

-*Criopreservazione strips di corticale ovarica* 65

-*Criopreservazione ovaio in toto*..... 66

PERCHE' CRIOCONSERVARE FRAMMENTI DI TESSUTO
OVARICO..... 67

LA FERTILITA' IN PAZIENTI ONCOLOGICHE 68

I POSSIBILI IMPIEGHI DEL TESSUTO OVARICO UMANO..... 72

-*Trapianto di tessuto ovarico: autotrapianto*..... 72

-*I rischi dell': autotrapianto*..... 73

-*Trapianto di tessuto ovarico: xenotrapianto*..... 74

ISOLAMENTO DEI FOLLICOLI: CRESCITA E MATURAZIONE
IN VITRO..... 75

STRATEGIA INNOVATIVA PER PRESERVARE LA FERTILITA':
ISOLAMENTO E VITRIFICAZIONE DEI FOLLICOLI..... 75

SCOPO 78

OVOCITI: MATERIALI E METODI..... 82

1. *Prelievo degli ovociti*..... 83

2. *Protocollo di congelamento lento*..... 84

3. *Protocollo di vitrificazione* 86

4. *Caricamento con Fluo 4-AM* 89

5. *Esposizione ovocitaria a soluzioni di equilibratura e
vitrificazione*..... 90

6. *Esposizione ovocitaria a ionoforo A23187*..... 90

7. *Determinazione dei livelli di calcio ionico intracellulare*..... 91

Indice

<i>8. Effetti del processo di vitrificazione sui livelli di calcio ionico intracellulare in ovociti freschi.....</i>	<i>92</i>
<i>9. Effetti del processo dei crioprotettivi sui livelli di calcio ionico intracellulare in ovociti freschi.....</i>	<i>93</i>
<i>10. Osservazioni ultrastrutturali mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM)</i>	<i>94</i>
<i>11. Analisi citochimica al microscopio a fluorescenza.....</i>	<i>95</i>
<i>12. Marcatura con miscela di reazione TUNEL</i>	<i>96</i>
<i>13. Localizzazione delle caspasi attivate: marcatura con l'inibitore fluorescente delle caspasi attivate FITC-VAD-FMK.....</i>	<i>97</i>
<i>14. Determinazione della polarità dei mitocondri: marcatura con sonda potenziale sensibile JC-1</i>	<i>97</i>
OVAIO: MATERIALI E METODI.....	100
<i>1. Prelievo di corticale ovarica umana e bovina</i>	<i>101</i>
<i>2. Preparazione del tessuto ovarico.....</i>	<i>101</i>
<i>3. Protocollo Li-Yu-Bin: vitrificazione e scongelamento</i>	<i>102</i>
<i>4. Protocollo Li-Yu-Bin con colina: vitrificazione e scongelamento</i>	<i>103</i>
<i>5. Protocollo Li-Yu-Bin: congelamento lento e scongelamento rapido</i>	<i>104</i>
<i>6. Protocollo con colina: congelamento lento e scongelamento rapido</i>	<i>105</i>
<i>7. Preparazione dei campioni per la microscopia ottica</i>	<i>105</i>
<i>8. Analisi statistica</i>	<i>107</i>
<i>9. Preparazione dei campioni per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM)</i>	<i>107</i>
<i>10. Isolamento dei follicoli.....</i>	<i>109</i>
<i>11. Saggi di vitalità.....</i>	<i>111</i>
<i>12. vitrificazione e scongelamento dei follicoli isolati.....</i>	<i>111</i>
OVOCITI: RISULTATI	114
<i>> Sopravvivenza ovocitaria</i>	<i>115</i>

Indice

> <i>Analisi ultrastrutturale di ovociti criopreservati con protocollo di congelamento lento</i>	115
> <i>Analisi mitocondriale negli ovociti criopreservati con protocollo di congelamento lento</i>	120
> <i>Frammentazione del DNA in ovociti criopreservati con protocollo di congelamento lento</i>	123
> <i>Caspasi attivate</i>	125
> <i>Analisi ultratrutturale in ovociti vitrificati</i>	126
> <i>Livelli di Ca²⁺ ionico intracellulare in ovociti freschi in risposta alle soluzioni di vitrificazione</i>	133
> <i>Effetti dello ionoforo A23187 sui livelli di Ca²⁺ ionico intracellulare in ovociti freschi e scongelati</i>	140
> <i>Effetti dei singoli crioprotettivi sui livelli diCa²⁺ ionico intracellulare in ovociti freschi</i>	142
> <i>Effetti della vitrificazione sui livelli diCa²⁺ ionico intracellulare in ovociti freschi</i>	143
OVAIO: RISULTATI	144
> <i>Analisi istologica</i>	145
> <i>Valutazione ultrastrutturale del tessuto ovarico</i>	151
> <i>Valutazione morfologica dei follicoli</i>	157
> <i>Analisi della vitalità dei follicoli</i>	159
> <i>Coltura dei follicoli</i>	160
> <i>Vitrificazione dei follicoli</i>	162
OVOCITI: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	163
OVAIO: DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	182
PERPLESSITA' E QUESTIONI ETICHE	193
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	195

PREMESSA

L'infertilità di coppia nel nostro Paese è una patologia diffusa e progressivamente in aumento con una incidenza di circa una coppia su dieci. Le pratiche di procreazione medicalmente assistita (PMA) necessarie per affrontarlo sono disciplinate dalla legge N°40 del 2004 che, oltre a proibire la fecondazione eterologa, la diagnosi preimpianto e la sperimentazione su zigoti ed embrioni, limita a tre il numero massimo di embrioni da produrre in vitro e, conseguentemente, allo stesso numero gli ovociti da inseminare, vietando al contempo la possibilità di criopreservare gli embrioni, di effettuare diagnosi genetica su embrioni pre-impianto, e consentendo la criopreservazione degli ovociti.

Intanto continua a crescere, in Italia, il cosiddetto fenomeno del "turismo procreativo"; le tecniche di fecondazione, soprattutto in alcune coppie caratterizzate da seri difetti nella qualità del liquido seminale e/o nella qualità ovocitaria e recettività uterina all'impianto dell'embrione, hanno sempre meno successo. Inoltre, in coppie in cui vi è assenza di fattore femminile e giovane età della paziente, si è registrato un significativo aumento delle gravidanze gemellari con conseguenti complicanze cliniche e problemi di natura sociale. Il "turismo procreativo" è altresì favorito dal divieto di effettuare diagnosi genetica pre-impianto e selezione degli embrioni da trasferire. Se da una parte i legislatori hanno imposto questo divieto per evitare programmi di eugenetica, la creazione di embrioni sovrannumerari, e la soppressione di embrioni

Premessa

geneticamente patologici, c'è da considerare che per determinate coppie portatrici di una serie di difetti genetici, così come in casi di età avanzata della paziente e conseguente elevata incidenza di ovociti/embrioni aneuploidi, la diagnosi genetica pre-impianto e la selezione embrionale costituisce l'unica strada percorribile. L'alternativa è rappresentata dalla diagnosi genetica post-impianto allo stadio fetale resa possibile dalla legge 194, ma sicuramente più cruenta da un punto di vista di età del concepito e con elevati impatti psicofisici sulla donna e sul proprio partner. Secondo i primi dati tendenziali, dunque, la tutela dell'embrione e la salute della donna, obiettivi sanciti dalla legge 40 sulla procreazione medicalmente assistita, sono sostanzialmente disattesi. La procreazione assistita ha di per sé una bassa probabilità di successo, che arriva all'incirca al 30%. Ciò significa che le coppie che vi accedono devono, in media, ripetere almeno tre volte la procedura prima di avere il cosiddetto "bambino in braccio". Un altro aspetto che emerge dall'analisi dei dati è quello che riguarda il "turismo procreativo", cioè il numero delle coppie italiane che sono state costrette a varcare il confine per effettuare una delle tecniche di PMA vietata dalla legge italiana. Secondo i dati forniti dall'Osservatorio del Turismo Procreativo di Roma, i viaggi all'estero delle coppie infertili negli ultimi 3 anni si sono quadruplicati: si sarebbe passati da 1066 a 4173. La Spagna è in testa, seguita da Belgio e Svizzera. E' da sottolineare che il turismo procreativo, naturalmente, comporta una discriminazione di natura economica.

Premessa

Come descritto, la legge 40 vieta l'inseminazione di più di tre ovociti che vengono recuperati dalla paziente vietando altresì la criopreservazione di eventuali embrioni non trasferiti in utero. Un divieto questo che nasce da considerazioni di natura etica sull'embrione e sulla sua tutela. In questo modo la legge evita la sovra-produzione di embrioni che, non venendo trasferiti in utero, perchè rischioso per la madre, risulterebbero essere eventualmente "abbandonati". Prescindendo per adesso da considerazione etiche sulla legge, di fatto tali limitazioni:

- abbassano innanzitutto il numero di embrioni prodotti;
- impediscono la selezione di quelli che hanno maggiori probabilità di nascita a termine;
- riducono la resa percentuale delle gravidanze ottenute nel nostro paese con tecniche di PMA;
- aumentano (conseguenza del divieto di inseminazione di più di 3 ovociti e di criopreservazione di embrioni) il numero di stimolazioni ormonali della crescita follicolare multipla ed i pick-up ovocitari a cui deve essere sottoposta la donna infertile per concepire in vitro.

Dal momento che la stimolazione ormonale della crescita follicolare multipla produce mediamente molto più di tre ovociti, tale legge ha introdotto la possibilità di criopreservare gli ovociti sovranumerari e ha esplicitamente incoraggiato il loro utilizzo a fini di ricerca previo appropriato consenso informato scritto da parte delle pazienti.

Premessa

In linea generale gli ovociti soprannumerari potrebbero essere congelati, scongelati ed inseminati sempre in un numero massimo di tre in caso di insuccesso del precedente tentativo di fecondazione o di trasferimento embrionale. In tal modo non solo si ridurrebbe lo stress psico-fisico a cui è sottoposta la donna nelle procedure di fecondazione assistita, ma inoltre la criopreservazione ovocitaria permetterebbe di:

- preservare la fertilità femminile fino ad aver consolidato la propria posizione socio-professionale o in casi di patologie pelviche, oncologiche con conseguenti chemio-radioterapie che distruggono la riserva ovarica delle pazienti, o interventi chirurgici che danneggino o eliminino la riserva ovarica.;

- evitare gli indiscutibili problemi etico-legali collegati alla criopreservazione degli embrioni;

- evitare i problemi di sincronizzazione donatrice/ricevente nei programmi di ovodonazione in contesti legali ove questa sia permessa.

Indubbiamente, riuscire a mettere a punto una metodica di criopreservazione ovocitaria capace di mantenere la competenza degli ovociti allo sviluppo embrionale pre e post impianto, sarebbe di grande beneficio non solo contesto legislativo italiano, ma anche in contesti internazionali. Purtroppo, nonostante il primo nato da embrioni generati da ovociti criopreservati abbia adesso più di venti anni, fino a due anni fa il numero di nati mediante tale biotecnologia riproduttiva a livello mondiale era di soli trecento. Tale bassissima resa è dovuta al fatto che gli embrioni prodotti a

Premessa

partire da ovociti congelati/scongelati, mediante le biotecnologie di criopreservazione ovocitaria adottate negli ultimi venti anni, hanno una potenzialità di sviluppo pre e post-impianto drasticamente ridotta rispetto a quella registrata con embrioni freschi o anche criopreservati, ma generati da ovociti freschi.

In tale contesto, è di vitale importanza:

- effettuare innanzitutto ricerche di base tese ad individuare danni da criopreservazione responsabili della ridotta competenza all'impianto ed allo sviluppo a termine registrati in studi clinici;
- utilizzare i "markers" di danno individuati per rifinire tecniche di criopreservazione in uso o allestirne di nuove prima di immetterle nella riproduzione assistita a livello clinico, senza averle preventivamente testate e validate su modelli animali e laddove possibile su materiale biologico umano.

Negli ultimi anni oltre alla criopreservazione ovocitaria, è nato un forte interesse da parte di numerosi gruppi di ricerca internazionali sulla possibilità di criopreservare tessuto ovarico umano. Tali biotecnologie di avanguardia sono rivolte alle pazienti che devono essere sottoposte a trattamenti chirurgici, terapie farmacologiche, chemio e/o radioterapie, che possano compromettere irrimediabilmente la funzionalità ovarica. Molto spesso, per motivi clinici così come nel caso di età prepubere, tali categorie di pazienti non possono essere sottoposte a stimolazione della crescita follicolare multipla e prelievo chirurgico degli ovociti, per cui non è possibile criopreservare questi ultimi per ripristinare la potenzialità riproduttiva dopo remissione della patologia. La necessità di

Premessa

sviluppare tecnologie efficienti per congelamento di tessuto ovarico è diventata sempre più impellente grazie alle nuove strategie antitumorali che hanno di gran lunga aumentato le percentuali di sopravvivenza media delle bambine e delle giovani donne affette da neoplasie quali leucemie, sarcomi, linfomi, tumori alla mammella, ponendo l'attenzione della comunità scientifica sugli effetti a lungo termine delle terapie oncosoppressive e sulla qualità della vita delle pazienti dopo il trattamento. La criopreservazione del tessuto ovarico è stata proposta come una tecnica alternativa al congelamento degli embrioni nella speranza di ripristinare la fertilità perduta (*Demeestere et al 2003*). Questa procedura sembrerebbe essere anche l'unica opportunità per giovani pazienti di conservare i propri gameti prima di iniziare trattamenti gonadotossici. (*Wallace et al., 2005*).

In letteratura, già da diversi anni vi è un acceso dibattito a riguardo di una strategia sperimentale ed eticamente valida per preservare o restituire la fertilità nelle suddette pazienti. In quest'ottica la criopreservazione si pone come una tecnica veloce e poco invasiva. Tuttavia, è da sottolineare che tali metodiche comportano un eventuale rischio di reintrodurre cellule tumorali al momento del reimpianto del tessuto ovarico, una volta terminata la terapia oncosoppressiva. Una possibile metodica alternativa per evitare il rischio di reintroduzione di cellule tumorali, ma che presenta una serie di difficoltà di ordine biologico e che è per ora poco percorsa nella letteratura scientifica, è costituita dall'isolamento dei follicoli ovarici e criopreservazione degli stessi.

Premessa

Lo scopo del presente lavoro è quello di studiare gli effetti di vari protocolli di congelamento sugli ovociti, sul tessuto ovarico e sui follicoli, in modo da evidenziare i danni indotti dal congelamento e individuare eventuali modifiche alle biotecnologie applicate. Tali metodiche saranno altresì valutate ed inquadrare da un punto di vista etico-morale. A tal fine, ovociti sovrannumerari sono stati ottenuti, previo consenso informato, da pazienti coinvolte in cicli di fecondazione assistita presso il centro Mediterraneo di fecondazione assistita, (responsabile Dott. ssa M. Iaccarino), mentre frammenti di tessuto ovarico sono stati ottenuti previo consenso informato da pazienti con differenti patologie sottoposte ad ablazione parziale o totale delle ovaie mediante laparoscopia presso l'unità Operativa di fisiopatologia della Riproduzione Sterilità di Coppia, Ospedale San Giuseppe Moscati di Avellino (responsabile Prof. R. Talevi). Data l'esiguità di tale materiale biologico, gli studi sull'isolamento e criopreservazione di follicoli ovarici sono stati condotti parallelamente su materiale biologico bovino.

INTRODUZIONE

La Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) ha da sempre stimolato norme sociali, sistemi legali, standard morali ed etici. Nonostante poche aree della medicina abbiano generato così tante controversie, è pur vero che da 20 anni or sono la PMA è stata offerta a migliaia di coppie, dando come frutti milioni di nascite in tutto il mondo. Purtroppo, le molte possibilità offerte dalle tecniche di PMA, sono spesso annebiate da dilemmi di natura etica e morale come ad esempio, la donazione dei gameti, la surrogazione, la diagnosi preimpianto, la riduzione fetale, il congelamento degli embrioni, l'utilizzo degli embrioni quali fonte di ricerca e la soppressione degli stessi giacenti da decenni nelle banche. Al momento di prendere la decisione per dare o meno inizio ad un ciclo di procreazione assistita, molti sono i dubbi e le perplessità etiche che vi si presentano. Le controversie e l'ampia applicazione delle tecniche di procreazione assistita, sono state di grande impatto sulle relazioni e sul significato della riproduzione nella società. Per l'individuo, molte questioni a livello sociale e legale sembrerebbero essere ancora irrisolte, quali ad esempio l'accesso alle tecniche di PMA a coppie non eterosessuali, la selezione di gameti o embrioni al fine di decidere il sesso del nascituro, il compenso da corrispondere alle persone coinvolte in programmi di donazione. Spesso lo Stato ha tentato di appianare le controversie riguardanti la PMA attraverso le leggi, le quali sembrerebbero essere risultate riduttive e controproducenti per i successi delle tecniche stesse. Non si vuole adesso discutere l'ammissibilità o meno della legge che

disciplina le tecniche di riproduzione assistita nel nostro Paese (legge N°40, febbraio 2004), ma si vuole trovare, in accordo ai principi sanciti dalla legislazione, e ai principi etici morali, un'alternativa nell'ambito delle strategie di riproduzione, al fine di migliorarne le percentuali di successo.

GLI ASPETTI GIURUDICI: LA LEGGE 19 FEBBRAIO 2004 N°40.

La procreazione medicalmente assistita in Italia è disciplinata dalla legge n°40 approvata dal Parlamento il 19 febbraio 2004. La legge legittima la PMA omologa, ovvero la fecondazione con gameti di persone sposate tra loro o di persone di sesso diverso conviventi, maggiorenni ed in età potenzialmente fertile (art.5). Vieta la fecondazione eterologa, ovvero la fecondazione con gameti di terzi estranei alla coppia (art.4); riconosce al concepito la qualifica di soggetto di diritto (art1); vieta: qualsiasi tipo di sperimentazione su embrioni umani (art 13), la crioconservazione e la soppressione degli embrioni (art.14); riconosce la possibilità di produrre non più di tre embrioni per volta -numero necessario ed unico- da trasferire contemporaneamente in utero (art.14); vieta qualsiasi tecnica che possa predeterminare o alterare il patrimonio genetico dell'embrione (art.13); prevede l'obbligo del consenso informato (art. 6); prevede sanzioni amministrative e penali per i medici che contravvengono ai divieti sanciti dalla legge e per chi opera esperimenti su embrioni umani (artt.12 e 13).

ASPETTI CRITICI DELLA LEGGE 40:

Nell'articolo 1 della legge si afferma che la PMA è consentita qualora non vi siano altri metodi terapeutici capaci di rimuovere le cause di infertilità o sterilità.

In tal senso la PMA è vista solo come metodo di cura della sterilità o dell'infertilità escludendo a priori le coppie fertili, ma portatrici di malattie genetiche piuttosto gravi trasmissibili alla prole.

All'articolo 1, inoltre viene precisato che tutti i diritti dei soggetti coinvolti devono essere assicurati, compreso il concepito al quale viene riconosciuta la qualità di soggetto di diritto. Non vi è dubbio qui che il legislatore abbia accolto la volontà di coloro i quali sostengono che l'embrione sia persona, ovvero un individuo con capacità razionali. Da qui ne consegue che l'embrione umano deve essere ritenuto e trattato come soggetto e come persona.

Viene vietata la possibilità di una fecondazione eterologa (art 4 comma 3). In tale articolo forse emerge la posizione più dura di tutte che rende la disciplina anomala rispetto a quella di quasi tutti i paesi dell'unione europea.

Il consenso e la sua revoca: il medico ha l'obbligo di informare in maniera dettagliata i soggetti che ricorrono alle tecniche di PMA prima che queste vengano applicate, sui risvolti bioetici, e sui possibili effetti collaterali, psicologici, sanitari, sulle relative condizioni giuridiche della donna dell'uomo e del nascituro. Al comma 3 dello stesso articolo si prevede che la volontà di sottoporsi a determinate tecniche venga espressa per iscritto e viene decretata la possibilità di

revoca della volontà fino al momento della fecondazione dell'ovulo da parte di ciascun soggetto. Purtroppo però questa disposizione sembrerebbe essere inapplicabile visto che non si fa riferimento alcuno a quali siano le conseguenze in caso di un eventuale revoca dopo la fecondazione dell'ovulo. Difatti, se la donna dovesse decidere di revocare la propria volontà, ci sarebbe un trasferimento coattivo degli embrioni come stabilito dall'articolo 14 comma 1 e 3 della presente legge. Inoltre sorge un'altra questione circa il da farsi con gli embrioni già prodotti, allorché la donna dovesse revocare il proprio consenso, visto che questi non possono essere congelati, nè donati a terzi, nè soppressi, nè usati come oggetti di ricerca (artt 13 e 14). Qualora la revoca provenisse dal medico, questi dovrebbe agire esclusivamente per motivi medico sanitari e dovrebbe altresì fornire delle approfondite informazioni alla coppia.

Condizione giuridica del nato: secondo quanto sancito dall'articolo 8, tutti i nati a partire da tecniche di PMA godono dello status di figli legittimi, qualora i genitori siano uniti in matrimonio. Nel caso si trattasse di una coppia di conviventi , i nati verrebbero ad avere lo status dei figli riconosciuti dalla coppia. Si ravvisa una disparità tra i figli procreati naturalmente da coppie di fatto, poichè questi non vengono riconosciuti automaticamente, ma occorre l'atto di riconoscimento da ambo i genitori. Anche in tal caso esistono forti perplessità visto che si fa molta differenza tra lo status del figlio legittimo e del figlio della fecondazione assistita.

Misure di tutela dell'embrione: qualsiasi sperimentazione sull'embrione è vietata, ma la legge consente al contempo di

effettuare ricerche cliniche e sperimentali a patto che si perseguano finalità diagnostiche e terapeutiche, volte alla tutela e alla salute dell'embrione e solo quando non sia possibile applicare una metodologia differente. Le tecniche di produzione degli embrioni non devono superare il numero massimo di *tre*; qualora risulti impossibile il trasferimento, è concessa la criopreservazione dell'embrione fino al successivo impianto che dovrà susseguirsi non appena possibile (art 14 comma 2). E' vietata la riduzione embrionaria in caso di gravidanze multiple, anche se in questo caso, come nel precedente, vale la legge 194 del 1978, dove l'interruzione di gravidanza è ammessa entro i primi 90 giorni dal concepimento, solo se portare la gravidanza a termine risultasse essere pericoloso per la salute fisica o psichica della donna in relazione al suo stato di salute, economico, familiare, ecc. Facendo il punto della situazione : gli embrioni non possono essere soppressi prima dell'impianto e devono essere impiantati anche se portatori di anomalie, salvo il diritto della donna di interrompere la gravidanza una volta impiantato l'embrione. Non viene tenuto in considerazione il pregiudizio fisico e psichico che la donna deve subire facendosi impiantare un embrione pur avendo la consapevolezza di dover abortire. La contraddizione che ne emerge è tra i diritti della donna e i diritti dell'embrione.

L'INIZIO DELLA VITA E LO STATUTO DELL'EMBRIONE

E' spesso difficile precisare un inizio, particolarmente nei cicli biologici, poiché la vita è continua. Tuttavia ciascuna vita individuale ha due confini precisi: la fecondazione e la morte. Le cellule spermatiche e le cellule uovo non sono in grado da sole di iniziare una vita indipendente. Una volta rilasciati rispettivamente dai testicoli e dall' ovaio , la durata della vita di uno spermatozoo e di una cellula uovo è limitata a poche ore. Solo la loro fusione è in grado di originare una cellula con possibilità di sopravvivenza e di dare origine a un individuo indipendente oltre che a una nuova generazione. Infatti al momento della fecondazione avviene qualcosa di incredibilmente straordinario ed unico: l'ovocita si rende impenetrabile ad altri spermatozoi, e tutto ciò che viene racchiuso nel citoplasma ovocitario in quel momento (vale a dire il patrimonio genetico dei due gameti) è capace di organizzarsi e di assicurare tutto il necessario affinché si formi un nuovo individuo. Tale sviluppo avviene con gradualità, organizzazione e coordinazione, fino a portare in poco meno di un anno alla nascita di un individuo. In effetti, a partire dalla fecondazione, sia lo zigote, sia l'ootide, sia l'embrione sono da considerarsi "essere umano" e quindi "persona". Come ha affermato il padre della fecondazione artificiale francese, Jacques Testart, le tecniche di PMA hanno reso l'embrione "visibile", pertanto non lo si può più guardare e trattare come

un oggetto di selezione e di studio sul quale è semplice intervenire.

Sintetizzando in termini biologici, un *essere umano* è un “*essere*” dal momento della fecondazione fino alla morte. Nessuno stadio di sviluppo può essere definito non umano.

INFERTILITA'

Con il termine *infertilità* s'intende l'incapacità di una coppia di concepire dopo 12 mesi di rapporti non protetti, avvenuti in fase ovulatoria (*Jones HW Jr, et al., 1993*). Quest'intervallo di tempo deve essere ridotto a sei mesi nelle coppie meno giovani, in quanto sia nella donna sia nell'uomo la fecondità ha un apice intorno ai 25 e declina gradualmente dopo i 32 anni.

La *World Health Organization (WHO)* ha stimato che circa il 10-12% delle coppie non riesce ad ottenere una gravidanza. Questo significa che su scala mondiale 50-80 milioni d'uomini e donne hanno problemi di infertilità. Non ci sono regole di natura biologica o medica che possano escludere a priori la presenza contemporanea di disturbi del sistema riproduttivo in entrambi i partner, tanto è vero che problemi comuni ad entrambi sono diagnosticati nel 15-30% di coppie infertili. L'incidenza dell'infertilità è molto simile in entrambi i sessi: il fattore femminile è il solo responsabile nel 30-40% dei casi, il fattore maschile è coinvolto nel 10-30% dei casi (*Whitman-Elia G.F. et al., 2001*). L'infertilità può essere distinta in *primaria* quando la coppia non ha mai avuto gravidanze, e *secondaria*

quando si instaura dopo un periodo di documentata fertilità. Le cause della sterilità possono essere legate ad una condizione patologica della donna, dell'uomo o di entrambi (*McLachlan et al., 2005*). E' possibile tuttavia che al termine del più accurato iter diagnostico non si giunga ad individuare un fattore capace di impedire la riproduzione. Si parla in questo caso di *sterilità da causa inspiegata o idiopatica*, la cui incidenza viene oggi calcolata intorno al 5 –10% di tutte le forme di sterilità.

E' opportuno tenere presente che la prognosi di questo tipo di sterilità è talora peggiore ai fini del recupero della fertilità, rispetto ai casi in cui è possibile individuare un preciso fattore causale.

Il numero di coppie incapaci di avere bambini è considerevole ed in continuo aumento sia per cause sociali che ambientali.

Una coppia fertile con un'età media di 20 anni, che abbia una regolare attività sessuale, ha ogni mese una possibilità su quattro di concepire. Ciò significa che circa nove coppie su dieci che tentano una gravidanza riusciranno a concepire nell'arco di un anno. In ogni modo, una su dieci non riuscirà nell'intento; a questo gruppo appartengono sia coppie subfertili che coppie sterili (il termine sterilità verrà impiegato per descrivere entrambe).

Oggi si calcola, nel nostro Paese, che oltre il 20% delle coppie ha problemi riproduttivi (*Bilotta et al., 1999*). Con una nuzialità annua di circa 300.000 matrimoni, si può stimare che ogni anno in Italia 60.000 nuove coppie abbiano difficoltà nel concepire, le quali vengono ad aggiungersi a quelle degli anni precedenti non trattate o con terapie in corso (WHO, 2001).

L'incidenza di sterilità nella popolazione italiana è stata valutata pari al 11.3% delle coppie di età compresa tra 25 e 44 anni (WHO, 2001). Tale incidenza tende ad aumentare progressivamente con l'età passando dal 5.6% nella fascia di età compresa tra i 25 ed i 29 anni, al 11.7% nella fascia tra i 30 ed i 34 anni, al 13.7 % nella fascia tra i 35 ed i 39 fino al 14.7% nella fascia di età tra i 40 ed i 44 anni (*Van Der Steeg et al., 2005*).

Tra le possibili cause di infertilità si indicano essenzialmente i seguenti fattori:

1. Fattore maschile
2. Endometriosi;
3. Fattore tubarico;
4. Altre cause;
5. Forme idiopatiche.

Dai dati esposti risulta quindi chiara l'importanza delle tecniche di fecondazione assistita nella terapia dell'infertilità.

TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA

In seguito ai progressi fatti negli ultimi anni, soggetti, precedentemente definiti sterili, e quindi definitivamente infertili, possono oggi procreare in vitro.

Di seguito si illustreranno le caratteristiche generali delle più utilizzate tecniche di riproduzione assistita seguendo la cronologia secondo la quale esse sono state ideate ed applicate.

Le pazienti vengono trattate con agonisti o antagonisti del GNRH per sopprimere il ciclo endogeno ipofisario ed ovarico e una volta che ciò è avvenuto vengono trattate con FSH ricombinante per guidare una intera coorte di follicoli, e non uno solo come nel ciclo naturale, verso la maturità. Tale metodo viene denominato induzione della crescita follicolare multipla e il suo sviluppo è stato fondamentale nel successo della riproduzione assistita in quanto ha permesso di utilizzare più ovociti, tipicamente dai 5 ai 20 od oltre, ed ottenere più embrioni. Di fatto sia nella riproduzione naturale che in vitro gli ovociti dei mammiferi presentano differenze nella loro competenza allo sviluppo. Dopo la fecondazione infatti essi differiscono nella capacità di supportare lo sviluppo pre e post impianto. La gran parte si arresta già nei primi 5 giorni di sviluppo non raggiungendo lo stadio di sviluppo di blastocisti immediatamente precedente all'impianto. La capacità di superare momenti critici dello sviluppo embrionale viene denominata "qualità ovocitaria" e successivamente embrionale. Esistono numerosi parametri morfologici e dinamici, quali la velocità e morfologia delle segmentazioni, che permettono

all'embriologo di selezionare gli embrioni di migliore qualità e cioè quelli che presentano una più elevata probabilità di esitare in una nascita a termine una volta trasferiti in utero. Gli embrioni soprannumerari vengono criopreservati e possono essere scongelati e trasferiti in utero se il trasferimento degli embrioni freschi non ha avuto successo oppure se la coppia desidera avere altri figli. Tale pratica, quindi, da un lato aumenta la possibilità di avere figli e minimizza il numero di stimolazioni ormonali per ottenere il successo, dall'altro apre il problema del destino degli embrioni soprannumerari "abbandonati".

Per quanto riguarda le metodiche sviluppate nella riproduzione assistita, la prima tra queste è la FIVET (fertilization in vitro and embryo transfer), la classica inseminazione che avviene in capsula Petri utilizzando ovociti prelevati da donne sottoposte a stimolazione ormonale della crescita follicolare multipla e seme capacitato in vitro; il trasferimento dell'embrione può essere effettuato dal giorno 2 al giorno 5 dalla inseminazione.

La ZIFT e la GIFT, alternative alla FIVET, nascono dal tentativo di ridurre la permanenza in vitro di gameti ed embrioni e in tali metodiche vengono trasferiti lo zigote oppure i gameti nella tuba di Falloppio, luogo in cui normalmente essi risiedono durante la riproduzione in vivo.

Nei casi di gravissima infertilità maschile vengono utilizzate altre tre tecniche : la MESA , la TESA e la TESE.

La MESA (microsurgical epididymal sperm aspiration) consiste in un prelievo chirurgico degli spermatozoi dall'epididimo, sede di maturazione degli spermatozoi prodotti dal testicolo al cui

interno gli spermatozoi sviluppano la loro motilità). Nella TESA (testicular sperm aspiration) e nella TESE (testicular sperm extraction) vengono prelevati gli spermatozoi dai testicoli, nel primo caso tramite una biopsia con agoaspirazione, nel secondo caso tramite una biopsia chirurgica (*Schoysman et al., 1997; Schlegel et al., 1999*). Tutte queste tecniche servono nei casi di grave infertilità maschile nei quali l'azoospermia è dovuta o ad un'ostruzione delle vie seminali (cioè gli spermatozoi vengono prodotti nel testicolo ma poi non passano nel liquido seminale) oppure ad un problema nel processo di formazione degli spermatozoi, ovvero nella spermatogenesi. In questo secondo caso è possibile prelevare chirurgicamente pochi spermatozoi o anche stadi immaturi quali gli spermatidi ed utilizzarli per la fecondazione in vitro. Le cellule spermatiche così recuperate saranno usate per una fecondazione in vitro, quasi sempre attraverso iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI, intracytoplasmic sperm injection) (*Silber et al., 1994*).

L'ICSI è una delle tecniche di maggior successo utilizzate nella fecondazione assistita; essa ha rivoluzionato il trattamento dei gravi casi di infertilità maschile (*Van Steirteghem et al., 1994; Nagy et al., 1995*).

Questa tecnica consiste nell'introduzione di un singolo spermatozoo direttamente nel citoplasma dell'ovocita bypassando così tutte le barriere della fecondazione naturale (passaggio attraverso le cellule del cumulo, interazione e legame con la zona pellucida, ZP, reazione acrosomiale, penetrazione spermatica attraverso la ZP e fusione con

l'olemma), (*Sathananthan et al., 1996; Nagy et al., 1996*). Infatti questa tecnica richiede che, prima dell'iniezione, l'ovocita maturato in vivo sotto lo stimolo delle gonadotropine (LH e FSH) e della gonadotropina corionica umana (hCG), venga denudato dalle cellule del cumulo e della corona radiata per visualizzare la posizione del 1° globulo polare e quindi indirettamente del fuso meiotico sottostante ed effettuare l'iniezione dello spermatozoo evitando in tal modo possibili danni meccanici al fuso meiotico ed ai cromosomi (*Nagy et al., 1996; Ubaldi et al., 1997*).

L'ICSI è quindi stata sviluppata allo scopo di recuperare la fertilità di coppie in cui il partner presenta difetti più o meno gravi del seme precedentemente non risolvibili. Tuttavia, l'avvento della legge 40 (19-2-2004) in Italia, che regola le procedure di fecondazione assistita e, in particolare, vieta la inseminazione di più di tre ovociti per singola paziente, ha esteso l'utilizzo di tale metodica pressochè a tutti i casi di infertilità trattati mediante procedure in vitro. La diffusione clinica dell'ICSI ad infertilità di coppia dove non è accertato un fattore maschile deriva dalla maggiore percentuale di fecondazione che si ottiene con tale metodica rispetto alla FIVET, dove anche in assenza di difetti riconoscibili nel seme e negli ovociti si può ottenere un fallimento parziale o totale della fecondazione.

È da osservare, tuttavia, che dal confronto delle percentuali di impianto e di gravidanza a termine e dello stato di salute della prole ottenute in seguito a FIVET e ad ICSI si inizino ad evidenziare delle percentuali di aborto significativamente più

elevate nei figli nati grazie a quest'ultima metodica (*Twisk et al., 2006; Philipp et al., 2006; Woldringh et al., 2005*).

Tali risultati possono essere dovuti alla tecnica di micromanipolazione di per sé, ma soprattutto alla scelta arbitraria dello spermatozoo “fecondante”, il quale viene scelto dall'embriologo clinico sulla base della sua motilità (quando è presente) e/o della sua morfologia osservata a fresco.

PRESERVAZIONE DELLA FERTILITA'

Grazie ad una vasta serie di biotecnologie in vitro si è potuto superare condizioni di infertilità di coppia dovute a fattori sia femminili che maschili. L'evoluzione delle biotecnologie della riproduzione assistita, sia essa in campo umano, sia essa in campo zootecnico, è dovuta a continui sviluppi della parte biologica di tali metodiche permettendo di affrontare numerosi casi di infertilità di coppia che erano sembrati, fino ad allora, irrisolti. Con l'avvento negli anni '50 della criopreservazione degli spermatozoi e negli anni '80 della criopreservazione degli embrioni, si è assistito ad un graduale miglioramento non solo nel trattamento dell' infertilità maschile, ma anche nelle percentuali di gravidanza delle coppie infertili; inoltre tali metodiche hanno portato al superamento di alcuni problemi etici connessi alla fecondazione assistita. Questo progresso biotecnologico ha portato però ad un numero crescente negli anni di embrioni sovrannumerari, ovvero “embrioni abbandonati”, ponendoci di fronte ad un nuovo problema di

natura etica stavolta riguardante lo statuto ontologico dell'embrione.

Da qui, molte le teorie in merito e soprattutto discordanti tra loro che possono, per così dire, essere generalizzate in 3 principali correnti di pensiero:

1. l'embrione è un individuo fin dal momento del concepimento
2. l'embrione è un individuo dal 14°giorno a partire dal concepimento, ovvero quando avviene il completo annidamento nell'utero materno
3. l'embrione è un mero grumo di cellule.

Questo è un dibattito che accompagna da sempre il mondo religioso, scientifico, culturale. Abbiamo da un lato un problema di natura etico-morale riguardante la concezione dell'embrione; dall'altro abbiamo la normativa vigente sulle metodiche di PMA che vieta sperimentazioni e congelamento embrionale. Si evince quindi che la via da percorrere, nell'ambito delle tecniche della procreazione medicalmente assistita -rigorosamente tutta italiana- è quella della criopreservazione degli ovociti: cellule e non ancora persone, quindi non toccate dai problemi di ordine etico sollevati dall'uso degli embrioni. Cellule che potrebbero conciliare i bisogni della scienza, il diritto alla procreazione femminile, e le esigenze etiche sia del mondo religioso che di quello laico.

Le difficoltà maggiori nell'utilizzo degli ovociti criopreservati nella fecondazione, per ora sono solo di ordine tecnico. I centri in grado di congelare gli ovociti nel nostro paese sono circa 30 su 384 che praticano la fecondazione assistita; 73 sono le

strutture in grado oggi di congelare gli ovociti; queste le cifre illustrate da Donato Greco dell'Istituto Superiore Della Sanità. In ogni caso l'uso degli ovociti congelati permetterebbe di risolvere i problemi di carattere etico-legali; di conservare la fertilità per le donne in carriera o soggette ad una rapida degenerazione follicolare; e di ridurre in tempi brevi fino all'80% ed oltre il numero degli embrioni congelati.

Il nostro Paese è all'avanguardia nella tecnica del congelamento ovocitario. Gli esperimenti pionieristici parlano chiaro: il primo bambino nato nel 1997 da uno spermatozoo e da un ovocita congelati è italiano.

Ma quali sarebbero nello specifico i vantaggi apportati dalla criopreservazione ovocitaria?

- 1) permette di superare problemi etici connessi al congelamento degli embrioni soprannumerari ed al loro futuro destino;
- 2) è indicata nei casi di infertilità maschile in cui al momento del prelievo ovocitario dalla paziente non sono disponibili spermatozoi viabili;
- 3) è utile nei programmi di ovodonazione permettendo di mantenere in quarantena gli ovociti fino al momento in cui si abbiano dati sicuri sulla assenza di malattie sessualmente trasmissibili nella donatrice;
- 4) permette di preservare la fertilità femminile in donne che prevedono di avere figli in età non ottimale da un punto di vista riproduttivo.

Negli ultimi 20 anni, strategie per preservare la fertilità non vengono più considerate soltanto per pazienti affette da flogosi

pelviche, malattie sessualmente trasmesse, endometriosi, ovaio policistico o altro, ma anche per pazienti colpite da cancro. Oggi più che mai, con l'avanzare delle tecnologie in campo oncologico, le percentuali di remissione dalla patologia oncologica risultanti dalla combinazione di tecniche diagnostiche più precoci e dai nuovi protocolli di radio e chemioterapie, aumentano sempre più; pertanto riuscire a preservare la fertilità in queste pazienti va a delinearsi come una questione di carattere sociale. E' stato dimostrato infatti che nel 2003 circa 650 milioni di donne sono state colpite da cancro (*Jemal et al., 2004*), e che l'8% era dato da donne in età inferiore ai 40 anni (*Oktay and Yih, 2002*). Si stima che in cinque anni il tasso globale di sopravvivenza al cancro sia passato dal 1995 al 2001 rispettivamente dal 56% al 64%. Mentre i tassi di sopravvivenza in età pediatrica sono passati in 30 anni a partire dal 1965 dal 56% all'80% (*Greenlee et al., 2001*). Inoltre *Blatt nel 1999* aveva predetto che nel 2010 circa 1 adulto su 250 sarà sopravvissuto al cancro. Tali previsioni associate alle terapie d'avanguardia hanno stimolato la realizzazione di protocolli capaci di preservare la fertilità femminile che non compromettano la sopravvivenza delle pazienti. Oltre alla criopreservazione ovocitaria, negli ultimi anni, si sta affermando nel mondo delle tecniche di PMA il congelamento di tessuto ovarico. Di sicuro la metodica non richiama nessun tipo di problema di natura etica ed altresì preserva la potenziale fertilità di tutte quelle pazienti in età pre-pubere o in età riproduttiva che, sottoposte a cicli chemioterapici che col tempo porterebbero ad una

degenerazione ovarica, sono desiderose di maternità dopo terapia e guarigione. Ancora la conservazione del tessuto ovarico è stata proposta anche per giovani adolescenti affette dalla sindrome di Turner al fine di preservare i loro gameti prima della degenerazione delle ovaie. (*Abir et al., 2001; Hreinsson et al., 2002*). Molti i dati positivi ottenuti dopo trapianto di tessuto ovarico nel mondo animale: topo (*Candy et al., 2000*); coniglio (*Almodin et al., 2004*) e pecora (*Godsen et al., 1994*); ma sono soprattutto i risultati ottenuti nell'uomo che rendono tale metodica particolarmente incoraggiante. Infatti nel 2000 Oktay riporta il primo caso di ripristino della funzionalità ovarica dopo trapianto ortotopico di cortex ovarico congelato (*Oktay and Karlikaya, 2000*).

STRATEGIE PER PRESERVARE LA FERTILITA' NEL PAZIENTE ONCOLOGICO

Sebbene vi siano numerose strategie per preservare la fertilità in pazienti oncologiche, nessuna purtroppo può essere elevata al grado di affidabilità del congelamento del liquido seminale nell'uomo. Le strategie sono più o meno tutte invasive e prevedono somministrazione di farmaci e possono essere qui di seguito riassunte:

1. congelamento embrionario
2. congelamento o vitrificazione degli ovociti per futura IVF
3. crioconservazione del tessuto ovarico o di ovaio intero per futuro reimpianto

4. crioconservazione di follicoli isolati per successiva In Vitro Maturation (IVM)
5. trasposizione ovarica prima della radio terapia
6. protezione ormonale con analoghi GnRH
7. protezione farmacologica con farmaci antiapoptotici
8. trattamento conservativo nei tumori maligni (*Kim , 2006*).

Tutte le strategie, eccetto il congelamento embrionario sono tuttavia considerate ancora sperimentali, ma criopreservare gli embrioni va al di là di ogni morale, almeno nel nostro sistema etico-legale. La scelta dell'appropriata strategia è in relazione quindi al tipo di tumore, al tipo e alla durata della terapia, all'età della donna e al suo stato civile.

Crioconservazione embrionale

La crioconservazione di embrioni di mammifero ebbe il primo successo nel 1972 quando dopo trasferimento di morule murine previamente congelate e scongelate, furono ottenuti topi vivi (*Witthingham et al., 1972*). Solo il decennio successivo faceva registrare il primo successo in campo umano: una gravidanza singola (*Trounson and Mohr, 1983*) ed una gemellare (*Zeilmaker et al., 1984*). I risultati nei vari anni, hanno permesso di mettere a punto protocolli capaci di incrementare le percentuali di successo fino ad arrivare ai giorni nostri, dove tale tecnica sembra essere per lo più consolidata. Attualmente protocolli standardizzati si basano sul congelamento lento utilizzando 1,2-propandiolo 1.5M e saccarosio 0,1M e prevedono uno scongelamento rapido. Negli ultimi tempi invece il congelamento lento sta lasciando spazio alla

vitrificazione embrionale dove i tempi di esposizione ai crioprotettivi vengono ridotti, ma le loro concentrazioni sono di gran lunga maggiori (*Cremades et al. 2004*).

Vantaggi: Questa è senz'altro la tecnica più affidabile e comprovata: richiede circa 10-14 giorni di stimolazione ovarica dall'inizio del ciclo mestruale; raccolta di ovociti; IVF, embryo freezing e successivo impianto. Tale tecnica aggiunge circa l'8-10% in più di gravidanze per ogni ciclo di stimolazione ovarica. Essa permetterebbe inoltre di eseguire uno screening genetico su un blastomero, nei casi in cui si presentino malattie genetiche nella storia familiare della coppia, mentre il resto dell'embrione rimarrebbe congelato.

Svantaggi: la metodica non può essere adottata nei casi in cui:

- la terapia tumorale debba istantaneamente cominciare;
- nei pazienti con tumori estrogeno sensibili, quali ad esempio il tumore al seno. Infatti la necessità di indurre una stimolazione ovarica con gonadotropine, porterebbe ad una esposizione ad estrogeni che determinerebbero un aumento della proliferazione maligna (*Mitwally and Casper, 2004; Oktay et al, 2005*);
- nei pazienti prepuberi o in età adulta ma senza un partner donatore di sperma.

Inoltre le restrizioni di tipo legale della legge 40/2004, in caso di "abbandono di embrioni" inutilizzati nell'ambito di cicli di fecondazione assistita, rendono tale metodica inapplicabile, almeno nei limiti consentiti dalla legge. Dunque nonostante l'efficienza, la criopreservazione embrionaria rimane limitata.

Criopreservazione ovocitaria

La criopreservazione ovocitaria è stata auspicata da tutti per molto tempo, ma a causa della complessità della tecnica e della persistenza di alterazioni genetiche emerse dal congelamento di ovociti di diverse specie animali, è andata avanti lentamente. Sebbene la resa ottenuta è inferiore a quella ottenuta per il congelamento embrionario, (*Van Steirteghem A., 2002*), essa rappresenta ormai la tecnica complementare ai programmi di procreazione medicalmente assistita (*Borini et al., 2006; Flamigni C., 2002*). Nonostante sia stata registrata una bassa efficienza ottenuta in termini di % di gravidanza, tra l'1% e il 5%, (*Stachecki and Cohen, 2004; Borini et al., 2006; Levi Saetti et al, 2006*), tale metodica è stata ed è tutt'ora applicata tra le pratiche cliniche in molti centri (*Porcu, 2005; Fabbri et al, 2001*). Trattasi di un metodo alternativo al congelamento embrionario che risolve problemi etici-legali e morali legati allo stoccaggio degli embrioni. Inoltre permette di preservare la fertilità in pazienti soggette a patologie pelviche importanti o a sindrome di prematuro fallimento della riserva follicolare. I protocolli di congelamento comunemente utilizzati si basano su metodica lenta/scongelo rapido. Le soluzioni di congelamento sono a base di 1,2-propandiolo 1.5 M e saccarosio da 0,1 a 0,3M. Anche per gli ovociti (*Fabbri, 2001*), così come per gli embrioni, la vitrificazione va inserendosi sempre più con dei protocolli innovativi a base di dimetil solfossido (DMSO) e glicol etilenico (EG) (*Kuwayama, Vajta 2001*). E' possibile congelare ovociti sia allo stadio di metafase II (MII), sia allo stadio di vescicola germinativa (GV). Gli ovociti in MII sono

delle cellule altamente specializzate caratterizzate da un grosso volume, da un apparato del fuso meiotico, zona pellucida e granuli corticali. Ciò rende il congelamento senza dubbio più difficile, sia per quanto concerne l'entrata dei crioprotettivi, sia per la presenza di strutture già preformate estremamente sensibili ai bruschi cambiamenti di temperatura. Allo stadio di GV gli ovociti sono piccoli e quiescenti, caratterizzati da cromosomi avvolti da una membrana nucleare. Pertanto l'assenza di strutture altamente sensibili al raffreddamento, rendono tali cellule più idonee al congelamento, in relazione soprattutto alle % di sopravvivenza allo scongelamento (*Boiso et al, 2002*). I dati sperimentali hanno però fatto registrare una bassa percentuale di maturazione in vitro dopo scongelamento ed una qualità embrionale inferiore rispetto agli ovociti congelati e scongelati in MII.

Vantaggi: Il congelamento degli ovociti trova la sua applicabilità, laddove è concesso il congelamento embrionario, nei casi di mancanza di partner, ma al contempo rappresenta un'ottima strategia di preservazione della fertilità in pazienti oncologiche o in donne che decidono di post-datare la maternità, o in donne che partecipano a programmi di ovodonazione. Anche se i dati riguardanti le % di sopravvivenza post-scongelamento siano abbastanza discordanti, tale metodica rappresenta una vera e propria sfida per la ricerca.

Svantaggi: il congelamento degli ovociti che eticamente non pone alcun problema, trova molti ostacoli di natura biologica, quali le grosse dimensioni cellulari, la presenza di microtubuli e fuso meiotico che risultano essere particolarmente sensibili allo

stress da freddo. Gli ovociti sono estremamente sensibili ai bruschi cambiamenti di temperatura e difficilmente riescono a riparare i danni citologici. Ciò ha come conseguenza il basso numero di ovociti sopravvissuti allo scongelamento (*Van der Elst, 2003*). Oltre a problemi a carico del fuso meiotico (*Baka et al, 1995; Pickering et al, 1990*) in quanto le basse temperature ne inducono la depolimerizzazione, ci sarebbe da aggiungere un indurimento della zona pellucida dovuta ad un rilascio prematuro di granuli corticali, che inibisce la penetrazione da parte dello spermatozoo. Nonostante tutto però il congelamento ovocitario si pone potenzialmente come la migliore strategia di preservazione della fertilità nella donna.

Criopreservazione di tessuto ovarico

I primi esperimenti di criopreservazione di tessuto ovarico risalgono al 1953, quando tessuto ovarico murino fu congelato in una soluzione di glicerolo a -79°C (*Parker and Smith, 1953*), mentre la prima gravidanza si ottenne 7 anni più tardi, sempre nel topo. Solo negli ultimi 15 anni si vanno sviluppando protocolli di congelamento ovarico validi anche per l'uomo, e la prima tecnica applicata all'uomo risale al 1996 (*Steel and Newton, 1996*). Nello stesso anno è stata dimostrata la resistenza del tessuto ovarico al congelamento e che i follicoli primordiali in esso contenuti sono più resistenti ed in grado di sopportare i danni provocati dal congelamento scongelamento.

Vantaggi: E' una procedura vantaggiosa ed eticamente corretta. E' applicabile a pazienti in età prepubera oltre a pazienti che vogliono ritardare la propria maternità. La metodica non

presuppone stimolazione ormonale, spesso controindicata nei casi di alcuni tumori, non sottopone la donna sana ad uno stress psico-fisico dovuto ai ripetuti cicli di stimolazione ovarica. Il congelamento può interessare una strip o l'intero ovaio. La prima gravidanza da ovaio fu ottenuta nel topo circa 60 anni fa (*Parrot, 1960*), mentre è da appena 15 anni che sono stati messi a punto protocolli rivolti anche all'uomo. I protocolli utilizzati anche in questo caso vanno da quello lento a base di propandiole (Pr-OH) 1,5 M e saccarosio 0,2 M, alla vitrificazione a base di DMSO ed EG. Il protocollo ottimale di congelamento dovrebbe consentire di preservare l'integrità strutturale delle singole cellule e le interazioni intracellulari con le cellule della teca e della granulosa che sono necessarie alla ripresa dell'attività funzionale follicolare. In questo modo centinaia di follicoli verrebbero congelati insieme al tessuto il quale verrebbe poi in seguito reimpiantato alla completa remissione della neoplasia.

Svantaggi: lo svantaggio principale è dato dalla difficoltà di rivascularizzazione del tessuto una volta reimpiantato, oltre a perplessità circa il possibile reinstaurarsi di cancro in caso si tratti di pazienti oncologiche. Per quanto concerne il congelamento in toto dell'ovario, anche qui vengono incontrate una serie di difficoltà dovute alle grosse dimensioni dell'organo e quindi all'impenetrabilità dei crioprotettivi.

Criopreservazione dei follicoli isolati

Nel 2005 l'Ethics Committee of American Society for Reproductive Medicine, ha individuato nel congelamento

embrionario la migliore strategia riproduttiva. Ammettendo tale definizione da un punto di vista puramente teorico, in pratica molte donne non hanno un partner fisso oppure non hanno il tempo per iniziare un ciclo di stimolazione ormonale prima di dare inizio alla terapia oncosoppressiva. In Italia poi, non va dimenticato che il congelamento embrionario inteso in termini di preservazione della fertilità è vietato. Pertanto l'unico protocollo accettabile in questo caso sembrerebbe essere quello del congelamento ovarico. Una interessante prospettiva nella preservazione della fertilità in pazienti oncologiche è vista nell'isolamento e nel congelamento dei follicoli, previa maturazione in vitro (IVM). In effetti si tratterebbe di isolare meccanicamente o enzimaticamente i follicoli dalla corticale ovarica congelata e la loro successiva maturazione in vitro.

Vantaggi: la strategia sembra essere ottimale e promettente dal momento che si eliminerebbero i rischi di trasmissione di metastasi e di danno ischemico che potrebbero sopraggiungere dopo trapianto del tessuto ovarico.

Svantaggi: tuttavia i follicoli presenti nel tessuto congelato sono primordiali, pertanto risulta essere estremamente difficile riuscire ad indurre la maturazione in vitro. In effetti i fattori coinvolti nell'inizio della maturazione follicolare sono ancora non noti (*Gougeon, 1996*) oltre al fatto che necessitano diversi mesi affinché da uno stadio di follicolo primordiale si giunga a quello di antrale e attualmente non si hanno ancora terreni di coltura e protocollo specifici. Nel topo è stata sperimentata una strategia alternativa che ha fatto registrare grandi prospettive di successo. Infatti una volta isolate dalle ovaie delle strip di

tessuto, queste ultime sono state coltivate per 8 giorni, durante i quali ha inizio la crescita follicolare. A questo punto i follicoli sono stati isolati e la loro crescita continuata in vitro per 2 settimane. Gli ovociti maturi sono stati quindi recuperati ed inseminati (*Eppig and O'Brien, 1996*). Sebbene la percentuale di successo sia bassa, questa strategia sembra essere la favorevole per la crescita dei follicoli primordiali umani, in quanto l'interazione con le cellule stromali è essenziale durante le prime fasi di sviluppo.

LA CRIOPRESERVAZIONE

L'era della criobiologia moderna è stata segnata per la prima volta dal congelamento in glicerolo di spermatozoi di toro (*Polge, Smith & Parkers 1949*) anche se il vero e proprio successo si è avuto nel 1972 dopo la nascita di topolini a partire da embrioni congelati (*Whittingam, Leibo & Mazur 1977*). E' possibile criopreservare zigoti, blastocisti, spermatozoi, tessuto testicolare, ovociti, tessuto ovarico e fino ad oggi sembra che i protocolli messi a punto per il congelamento di spermatozoi ed embrioni diano delle rese percentuali soddisfacenti; non si può dire lo stesso però per il congelamento di ovociti .

Congelamento lento

Il congelamento lento è una pratica interamente computerizzata. Ha lo scopo di creare un gradiente di concentrazione tale da consentire una lenta fuoriuscita d'acqua dalla cellula accompagnata da un altrettanto lento ingresso di crioprotettore.

All'inizio del procedimento la cellula è esposta a concentrazioni moderate (1-2M) di crioprotettori penetranti (in genere DMSO e 1,2 propandiolo) e non penetranti (prevalentemente saccarosio) a temperatura compresa tra +10 e +30°C. Questo crea il giusto gradiente di concentrazione che dà inizio alla deidratazione e ad un ingresso lento nella cellula del crioprotettore penetrante, che riporta il volume cellulare a quello iniziale. Questo processo di deidratazione dipende in modo critico dai caratteri di permeabilità della membrana, dalla sua composizione, dal rapporto tra superficie e volume della cellula, dalla temperatura e dalla differenza di pressione

osmotica e rappresenta uno degli effetti critici del congelamento perché da esso può derivare la formazione di ghiaccio intracellulare. Il raffreddamento della cellula inizia applicando un gradiente di temperatura piuttosto elevato ($-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) fino al raggiungimento di una temperatura leggermente inferiore al punto di congelamento ($-4/-8^{\circ}\text{C}$). A questo punto s'induce dall'esterno la formazione di un nucleo di ghiaccio nella soluzione extracellulare (il cosiddetto seeding) e si prosegue poi con l'applicazione di un gradiente di diminuzione della temperatura molto più basso ($-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$), in modo da controllare la crescita dei cristalli di ghiaccio esterni neoformati. La graduale incorporazione dell'acqua nel ghiaccio in formazione, è associata ad un aumento della concentrazione dei soluti nella frazione non congelata. Si genera in questo modo un ulteriore gradiente osmotico che porta alla fuoriuscita di acqua dalla cellula e ad una ulteriore deidratazione. Se il congelamento si verifica con sufficiente lentezza, gran parte dell'acqua intracellulare fuoriesce e non si forma praticamente ghiaccio: tutto ciò accade fino a che non si raggiunge una temperatura compresa tra -30°C e -80°C e prima di trasferire i campioni in azoto liquido. Si tratta, evidentemente, di un gioco di equilibri: tempi abbastanza lunghi da consentire un'adeguata deidratazione, ma non così lunghi da esporre la cellula agli effetti tossici di elevate concentrazioni di soluti (*Mazur, 1990*).

Vitrificazione

La vitrificazione è una tecnica di raffreddamento ultrarapido. Le cellule o i tessuti sono preventivamente esposti a soluzioni

caratterizzate da un'elevata concentrazione di crioprotettori (6M) – penetranti e non penetranti- e poi ad un abbassamento rapidissimo della temperatura per immersione diretta in azoto liquido. Le soluzioni passano dunque, ad uno stato solido, come vitreo, in assenza di una formazione cristallina (*Fahy, 1986*). Questo stato mantiene la distribuzione ionica e molecolare dello stato liquido normale e può essere paragonato a quello di un liquido molto viscoso.

A differenza del congelamento lento è una pratica interamente manuale, che comporta tempi molto brevi, non sempre applicabili con precisione e poco riproducibili.

La vitrificazione consente, dunque, numerosi vantaggi, quali assenza di formazione di ghiaccio nella cellula e assenza di squilibri osmotici e ionici determinati dalla formazione di ghiaccio extracellulare. Ciononostante mostra il grande limite di esercitare effetti di tossicità acuta, soprattutto per eccessivo stress osmotico (*Rall, 1987*).

Scongelamento

A seguito del processo di congelamento, sia lento che vitrificazione, quando necessario le cellule o i tessuti vengono riportati a temperatura ambiente. La procedura di scongelamento è altrettanto delicata e critica quanto la fase di crioconservazione. Si basa su un aumento della temperatura molto rapido e su un'esposizione a soluzioni di crioprotettore progressivamente più diluite. Questa progressiva reidratazione ha lo scopo di evitare la ricristallizzazione e minimizzare gli stress osmotici. Per ricristallizzazione si intende il processo

attraverso il quale alcune molecole di acqua tornano nel citosol e riformano dei legami idrogeno con i cristalli di ghiaccio presenti, determinando un aumento significativo delle dimensioni cellulari. Per quanto riguarda lo shock osmotico, invece, esso si determina qualora il crioprotettore, precedentemente penetrato all'interno delle cellule, non si espande al di fuori abbastanza rapidamente. Ciò determina un afflusso di acqua nella cellula, determinandone un rigonfiamento e possibile esplosione.

Durante lo scongelamento devono, dunque, incontrarsi due necessità opposte: da una parte è importante ridurre al minimo il tempo di contatto tra la cellula ed il crioprotettore a temperatura ambiente, per contenerne la citotossicità temperatura-dipendente; dall'altra il processo di diluizione del crioprotettore all'interno del citosol deve essere molto graduale al fine di evitare l'eccessiva riduzione del potenziale osmotico extracellulare che causerebbe un massivo afflusso di acqua all'interno della cellula con conseguente lisi cellulare.

Crioconservazione con colina

Uno dei danni fondamentali indotti dal congelamento è rappresentato dalla destabilizzazione delle membrane, dovuto ad un incremento della concentrazione intracellulare di elettroliti (*Lovelock 1954*). Tra i vari elettroliti il sodio sembra svolgere un ruolo importante, in quanto essi sono i principali componenti dei mezzi utilizzati nella coltura delle cellule, crioconservazione compresa. Fisiologicamente il sodio diffonde

passivamente e liberamente nella cellula mentre specifiche pompe provvedono al ripristino dei valori ottimali. (Wolfe,1993). Nel processo di congelamento, l'aumento della concentrazione dei soluti nell'ambiente extracellulari determina:

- un efflusso di acqua dalla cellula
- una diffusione del sodio dalla cellula
- la graduale inattivazione delle pompe del sodio, conseguenza alle basse temperature. Pertanto l'aumento del sodio intracellulare risulta essere tossico per l'attività fisiologica cellulare apportando tutta una serie di danni a carico della cellula congelata. Per minimizzare gli effetti dannosi del sodio, alcuni studi hanno previsto la sostituzione dei Sali di sodio con la colina nei mezzi di congelamento ovocitario ed embrionario nel modello murino (*Stachecki et al, 1998*). Infatti lo ione colina non riesce ad attraversare la membrana cellulare non incidendo quindi sul carico cationico intracellulare. Ancora la colina è capace di associarsi ai fosfolipidi che costituiscono le membrane determinandone una maggiore stabilità (*Toner et al.,1993*).

DALLA CRIOPRESERVAZIONE DEGLI EMBRIONI A QUELLA DEGLI OVOCITI

Nella normale routine della PMA, congelare embrioni sovrannumerari significa diminuire il numero di embrioni da impiantare in un unico ciclo, ed avere una riserva di materiale nel caso si dovesse ripetere un secondo ciclo, incrementando

allo stesso tempo la probabilità di ottenere una gravidanza per ciascun ciclo di stimolazione. Negli ultimi anni le tecniche di conservazione mediante congelamento degli embrioni hanno fatto grandi passi avanti, si pensi che allo scongelamento le % di sopravvivenza si aggirano intorno all'80%. Purtroppo però, l'affermarsi sempre più di programmi di Fertilizzazione in Vitro ed Embryo Transfer, ha fatto sì che il numero di embrioni prodotti conservati nelle banche d'azoto sia aumentato sempre di più. Un aumento questo giustificato, infatti si è cercato di diminuire il numero di stimolazioni ormonali, non prive di rischi e complicazioni, alle quali sottoporre le donne. Al di là di ciò, la sovrapproduzione di embrioni e il loro congelamento ha da sempre trascinato con sé di pari passo problemi di natura etica che ha coinvolto non solo il mondo religioso, ma anche quello biologico oltre all'opinione pubblica. Tutto ciò ha reso la conservazione degli embrioni un fatto inaccettabile moralmente, e del tutto inattuabile dalla legge vigente in ambito delle tecniche di procreazione. L'ovvia alternativa, scaturita direttamente dalla legge 40, è criopreservare gli ovociti. Per quanto riguarda il congelamento degli spermatozoi, i protocolli sono altamente efficaci; la difficoltà nel criopreservare gli ovociti sta nel fatto che questa è una cellula grande circa 100 μm , che racchiude in sé tutte quelle informazioni necessarie alla formazione di un nuovo individuo. Sono passati infatti più di vent'anni ormai dall'annuncio della prima gravidanza ottenuta da ovociti congelati (*Chen, 1986*). Tali tentativi rappresentavano dei risultati sporadici, dal momento che non si riusciva ad ottenere le stesse % in termini

di sopravvivenza allo scongelamento rispetto agli embrioni. Le difficoltà incontrate non riguardavano solo la specie umana, infatti % di fecondazione insoddisfacenti venivano ottenute su ovociti di topo congelati (*Whittingham 1977*). Nel 1989 nella stessa specie *Carroll et al*, confermavano le basse % di fecondazione, oltre a denunciare una serie di alterazioni che compromettevano l'intero processo di fecondazione. Negli anni a seguire pochissime sono state le nascite ottenute con tale metodica che è stata via via quasi del tutto abbandonata. Si cominciava a rendere conto che in generale gli ovociti fossero delle cellule difficili da crioconservare. Le ragioni di questo insuccesso fu attribuito alla grossa dimensione dell'ovocita che limitava la deidratazione da parte dei crioprotettivi oltre all'elevata sensibilità del citoscheletro. In assenza di risultati incoraggianti, per circa un decennio questa strada fu tralasciata sia in ambito clinico che sperimentale dal momento che il congelamento degli embrioni rendeva molto di più. Solo dopo altri dieci anni, la notizia di una gravidanza ottenuta da ovociti scongelati unitamente all'ICSI (*Porcu et al., 1997*) ha nuovamente riaperto questa strada.

TRE BUONE “RAGIONI ITALIANE” PER CRIOCONSERVARE OVOCITI

Come già annunciato, sono passati 22 anni dalla prima nascita a partire da ovociti congelati/scongelati (*Chen, 1986*). Per circa 10 anni ci si è allontanati da tale metodica a causa dei pochi successi. Si aspetterà altrettanto tempo prima della notizia di una gravidanza ottenuta effettuando l'ICSI (iniezione

intracitoplasmatica dello spermatozoo) su ovociti congelati (Porcu et al., 1997). Questa nuova tecnica, ormai consolidata, ha permesso di superare tutta una serie di difficoltà incontrate dagli spermatozoi di penetrare la zona pellucida di un ovocita scongelato. Si pensi che da quel momento solo in Italia sono nati circa 200 bambini. Con l'arrivo però nel febbraio del 2004 della legge 40, limitazioni non solo di natura etica ma anche di natura legale, ponevano il divieto assoluto di congelare embrioni soprannumerari. Da questo momento il numero di pazienti che fa richiesta di criopreservare i propri ovociti è in continuo aumento. Esistono effettivamente tre buoni motivi tutti italiani per una donna di desiderare di congelare i propri gameti:

- 1) perchè deve sottoporsi a radio e chemio terapie che la renderanno sterile;
- 2) perchè sa di avviarsi verso un esaurimento precoce ovarico e vuole conservare il proprio potenziale riproduttivo ed utilizzarlo in seguito;
- 3) Perchè desidera semplicemente di spostare nel tempo la propria maternità, assicurandosi le migliori possibilità di successo.

La fertilità massima per una donna si ha intorno ai 20 anni, da questo momento in poi questa è in continua diminuzione. Pertanto le possibilità di avere un figlio dopo 30-40 anni si fanno sempre più basse. Di conseguenza, si potrebbe a 20 anni decidere di congelare i propri ovociti per poi utilizzarli in un programma di PMA dopo circa 15 anni. Sono ancora più ovvi i benefici di questa pratica per le donne che vanno incontro ad

una precoce menopausa o ad una perdita di fertilità a seguito di una cura chemioterapica. Su questo fronte sono in atto tutta una serie di studi e si può sperare in risultati sempre più positivi ottenuti non solo con l'impiego di ovociti congelati/scongelati ma anche in gravidanze ottenute dal congelamento, scongelamento, autotrapianto di tessuto ovarico.

PARTE I

CRIOPRESERVAZIONE OVOCITARIA

La criopreservazione degli ovociti può essere vista come un'alternativa alla conservazione degli embrioni, il che significa che potrebbe essere posta fine alle numerose controversie di natura etico-legale. Purtroppo in contrasto a quanto riportato per il congelamento degli embrioni umani, l'ovocita umano potrebbe rispondere in maniera negativa al congelamento (*Payntner 2000; Coticchio et al., 2004; Godsen 2005*).

I vari protocolli di criopreservazione differiscono tra loro per il tipo e la concentrazione di crioprotettivi interni (DMSO, PrOH, EG) ed esterni (Saccarosio, Glucosio) e per le velocità di congelamento scongelamento. Su tale base distinguiamo un protocollo di slow-cooling/fast thawing e uno di vitrificazione. L'ovocita è una cellula piuttosto grande (0.1 mm) che contiene un grosso quantitativo di acqua, pertanto saranno necessari tempi più o meno lunghi per permettere la completa disidratazione prima che le temperature vengano abbassate. Questo processo può essere minimizzato dall'uso dei crioprotettivi che abbassando il punto di congelamento della soluzione, permettono una più veloce disidratazione, preservando contemporaneamente l'integrità di membrana (*Shaw et al., 1993*). Altre modificazioni post-congelamento prevedono la riduzione delle attività enzimatiche e dei meccanismi di trasporto attivo. L'iniziale esposizione ai crioprotettivi induce una prima disidratazione riducendo al minimo gli effetti di cristallizzazione dell'acqua. Allo scongelamento i crioprotettivi (1,2-Pr-OH; DMSO) tossici per la

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

cellula, devono essere velocemente allontanati, mentre il saccarosio, con funzione osmotica provvederà a veicolare l'afflusso interno di acqua.

Nonostante le alte percentuali di fecondazione e cleavage (*Al-Hasani et al.,1987; Chen,1988;Gook et al., 1994,1995*) i dati raccolti fino ad oggi circa il congelamento ovocitario, non sembrano essere accettabili. Basti pensare che dai primi due casi di nascita a partire da ovociti congelati (*Chen, 1986; Van Uem, 1987*), da 20 anni or sono, nonostante siano stati sviluppati protocolli di congelamento più efficienti in termini di % di sopravvivenza post-scongelo e fecondazione mediante ICSI (iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo), le % di impianto restano insoddisfacenti (1-5%); e circa un terzo degli impianti esita in interruzioni spontanee della gravidanza (*Porcu 2001*), tant'è vero che si contano pochi nati a termine. I motivi di questa bassa competenza allo sviluppo vanno ricercati nei possibili danni indotti durante il congelamento nell'ovocita tra cui in primis:

-Effetti di cristallizzazione: formazione di cristalli intra ed extracellulari che causano danni meccanici alle membrane ed agli organuli.

-Effetti di soluzione: concentrazione dei soluti a causa della solidificazione dell'acqua e quindi variazione di pH, alterazioni molecolari, variazioni del volume cellulare.

-Effetti di ricristallizzazione: fusione di piccoli cristalli intracellulari in cristalli più grandi durante lo scongelamento.

Le difficoltà incontrate nelle procedure di congelamento ovocitario sono quindi collegate alle grosse dimensioni della

cellula, alla permeabilità della membrana plasmatica e alla fisiologia dell'ovocita.

Molti studi hanno dimostrato che la competenza allo sviluppo, ovvero la maturazione citoplasmatica è il risultato di tutta una serie di rimodellamenti strutturali e molecolari nel citoplasma dell'ovocita in maturazione. Una variazione del microambiente maturativo può influenzare negativamente tale acquisizione di competenza (*Watson et al., 2002*). Le forze osmotiche generate durante i cicli di disidratazione-reidratazione, la tossicità dei crioprotettivi, possono in qualche modo disturbare la funzionalità di diversi organuli; la struttura del fuso mitotico e della cromatina dell'ovocita in metafase II, fattori questi che incidono sulle % di sopravvivenza allo scongelamento. Le difficoltà collegate al congelamento ovocitario non riguardano solo il campo umano, ma anche quello animale: infatti sebbene nel topo si erano registrati tassi di sopravvivenza promettenti, quelli di fecondazione e sviluppo embrionale rimanevano variabili (*Whittingham, 1977; Carrol et al., 1990*).

In letteratura, sono stati pubblicati dei lavori che mostrano una certa discrepanza nei dati ottenuti dopo l'applicazione di protocolli di congelamento lento scongelamento rapido nella clinica medica. Da un lato, si riportano percentuali di sopravvivenza che vanno dal 75 al 90%, con percentuali di fecondazione ottenute comprese tra il 67-83%; mentre quelle di impianto vanno dal 37 al 57%. (*Shee van chen et al, 2005; Xiao Hong li et al. 2005; Barrit et al. 2007*) (tabella n° 1). Dall'altro lato invece, le percentuali di sopravvivenza allo scongelamento vanno dallo 37% al 74%; le percentuali di fecondazione

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

scendono (53-76%); mentre quelle di impianto sono circa 6 volte in meno (5-12%) rispetto a quanto precedentemente detto. Inoltre il valore percentuale di interruzioni di gravidanza è pari al 33-47% (*Borini et al. 2006; La Sala et al. 2006; Levi Setti 2006*) (tabella n° 2).

% DI SOPRAVVIVENZA	75-90%
% DI FERTILIZZAZIONE	59-82%
% DI CLIVAGGIO	54-90%
% DI IMPIANTO	~5.2 %
% DI GRAVIDANZA	~ 17%
% DI ABORTO	~ 33%

Tabella 1: valori medi riportati in letteratura circa i parametri riguardanti il congelamento ovocitario

	% SOPRAV.	% CLEAVAGE	% GRAVID.
<i>Borini et al., 2005</i>	37	86.3	25.4
<i>Chen et al., 2005</i>	75	70.2	11.2
<i>Gancitano et al.,2005</i>	41	53.6	13

Tabella 2: risultati discordanti circa il congelamento ovocitario.

Un rinnovato interesse verso il congelamento ovocitario si è avuto nel 1993, in seguito alla sostituzione del DMSO con il Pr-OH (*Gook et al., 1993*). Da qui in poi, si sono susseguiti una serie di protocolli che variavano per concentrazioni di

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

crioprotettivi permeanti (saccarosio) e non permeanti (Pr-OH) fino ad ottenere delle ottime rese % allo scongelamento quando veniva usato il saccarosio in concentrazioni elevate (0,2M; 0,3 M), anche se come già accennato non ci sono state grandi ripercussioni sulle % di fecondazione e impianto (tabella 3).

	1.5 M Pr-OH+ 0.1 M saccarosio	1.5 M Pr-OH+ 0.2 M saccarosio	1.5 M Pr-OH+ 0.3 M saccarosio
% sopravvivenza	50	72	74
% fecondazione	54	80	73
% cleavage	85	93	90
Impianti / 100 ovociti scongelati	2.3	9.1	2.4

Tabella 3: risultati clinici ottenuti con diversi protocolli di criopreservazione ovocitaria. (*Gook D.A. and Egdar D.H. Human reproduction 2007; 591-605*)

Cobo et al. (2001) usando probes per i cromosomi 13, 18, 21, X e Y, hanno mostrato che embrioni sviluppati dalla fecondazione di ovociti congelati con metodo lento a base di 1.5 mol/l PrOH e 0.2 mol/l saccarosio hanno tassi di aneuploidia simili a quelli di embrioni generati a partire da ovociti freschi (*Cobo et al., 2001*). Stachecki *et al.* (2004), hanno riportato che la percentuale di ovociti con corretta morfologia del fuso e dei cromosomi resta invariata dopo crioconservazione (76.7 e 76.7% versus 69.7 e 71.2%, in ovociti freschi e criopreservati rispettivamente). Tali autori hanno usato un protocollo lento in cui il sodio veniva sostituito dalla colina che è un catione meno tossico per cercare di ridurre il cosiddetto “solution effect”

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

durante il congelamento dell'acqua. Il rimpiazzamento del sodio cloruro con colina è stato dimostrato avere un effetto positivo su ovociti umani immaturi o maturati in vitro. Variazioni della temperatura di seeding e cioè di induzione della formazione di ghiaccio da -8 a -6 e a -4°C migliora progressivamente la sopravvivenza di ovociti umani. La combinazione della colina con una temperatura di seeding di -6°C (*Boldt J. et al., 2003*) ha prodotto 5 nascite a termine e 4 gravidanze in 11 pazienti che hanno ricevuto trasferimento di embrioni generati mediante icsi di ovociti criopreservati. La gran parte dei lavori riportati in letteratura ha considerato possibili danni a carico del fuso meiotico. Di fatto la criopreservazione può causare una disorganizzazione dei microtubuli del fuso e la dispersione dei cromosomi (*O'Neil et al., 1997*).

Si è rilevato infatti un aumento di anomalie cromosomiche in ovociti criopreservati post-maturazione in vitro (*Park et al., 1995*) ed anomalie della configurazione del fuso (*Boiso et al., 2002*).

Nello specifico si è visto che i danni a carico del fuso sono reversibili e che vengono recuperati dopo un paio d'ore di coltura in vitro post-scongelo; infatti aumentando la concentrazione di saccarosio da 0,1 M a 0,3 M, gli ovociti che presentavano un fuso normale erano il 70%, percentuale assolutamente comparabile a quella invece riscontrata negli ovociti freschi (73%). Pertanto sulla base di quanto detto sono da escludere le alterazioni della morfologia del fuso tra le

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

possibili concause della bassa competenza allo sviluppo embrionale degli ovociti criopreservati.

Congelamento lento a parte, bisogna ricordare che negli ultimi anni si sta affermando una nuova strategia di conservazione ovocitaria, nota come vitrificazione. Questa metodica si basa sul concetto fisico della solidificazione di una soluzione altamente viscosa senza cristallizzazione. Per aumentare la viscosità della soluzione di vitrificazione si impiegano concentrazioni di crioprotettore molto più elevate rispetto al congelamento lento (fino a 4-5 volte). Ciò genera un rischio di tossicità che rappresenta uno degli aspetti più problematici di questo metodo (*Quinn et al 1986*).

Alte concentrazioni di crioprotettivi quindi, impediscono totalmente la formazione di cristalli di ghiaccio; ma allo stesso tempo queste risultano essere tossiche per le cellule, instaurando una condizione altamente instabile. L'alternativa, al fine di evitare la nucleazione di ghiaccio, sia al congelamento che allo scongelamento, è congelare rapidamente. Infatti ad alte concentrazioni saline e a basse temperature le proteine vanno incontro a denaturazione agendo come una riserva di ioni. Una volta che la cellula ha raggiunto la temperatura fisiologica, gli ioni in eccesso vengono liberati, apportando degli effetti osmotici letali. I crioprotettivi hanno in effetti la funzione di minimizzare i danni da congelamento, dando così la possibilità di criopreservare. Per questo motivo sono stati introdotti dei miglioramenti nella tecnica di vitrificazione che tengono conto di alcuni parametri come la scelta della concentrazione dei crioprotettivi, il tempo e la temperatura di

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

esposizione a questi (*Fahy et al., 1990*). Nel 1985 è stata introdotta per la prima volta la vitrificazione su ovociti di topo (*Rall et al., 1985*) e da allora nuovi protocolli sono stati messi a punto per vitrificare gameti, zigoti embrioni di varie specie di mammiferi, uomo compreso. Era il 1999 quando il gruppo di Chen diede notizia che 7 ovociti MII vitrificati sopravvivevano tutti allo scongelamento, mentre 6 venivano fecondati, clivati e trasferiti (*Chen et al., 1999; ASRM 1999*). Successivamente si aveva notizia che su un totale di 474 ovociti vitrificati il 68,6% sopravviveva e di questo il 41,7% veniva iniettato (*Yoon et al 2003*). Purtroppo però le gravidanze descritte (*Kuwayama et al., 2005; Lucena et al. 2006*) sono state complessivamente poco più di trenta. I crioprotettivi permeanti maggiormente utilizzati per tale metodica sono Glicole etilenico, DMSO e Propandiolo. La velocità con cui penetrano all'interno, permettendo la fuoriuscita d'acqua, sono in relazione alla loro concentrazione e temperatura. Tra i protettivi non permeanti, anche per la vitrificazione, il saccarosio è quello che trova largo impiego. Il crioprotettore permeante inizialmente utilizzato era il Glicole etilenico, in quanto riesce a permeare velocemente l'ovocita agendo insieme al saccarosio. I tempi necessari a che ciò si realizzi non superano i 10 minuti, contro le 2 ore impiegate dal congelamento lento. Recentemente in associazione all'etilene glicole vi sono il Pr-OH o il DMSO, al fine di aumentare la concentrazione dei crioprotettivi, che deve essere direttamente proporzionale al tempo di durata della vitrificazione, per evitare stress tossico. Altro aspetto da tener presente per la vitrificazione è la scelta del supporto che può

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

incidere pesantemente sulla sopravvivenza allo scongelamento. In letteratura vi è riportata una vasta gamma di supporti per la vitrificazione e vengono distinti a seconda del contatto ovociti-azoto diretto o indiretto. Per i sistemi a contatto diretto ritroviamo: griglie per la microscopia elettronica (*Martino et al., 1996*); pulled straw (*Vajta et al., 1998*); cryoloops (*Lane et al., 1999*) (fig 1a, 1b, 1c) . Per i supporti isolati dall'azoto si ritrovano: cryotop (*Kuwayama et al., 2005*), cryoleaf e cryotips (*Kuwayama et al., 2005*), (fig. 1d, 1e). Allo scongelamento i crioprotettivi non permeanti sono presenti in concentrazioni decrescenti mentre il saccarosio rimane ad una concentrazione costante.

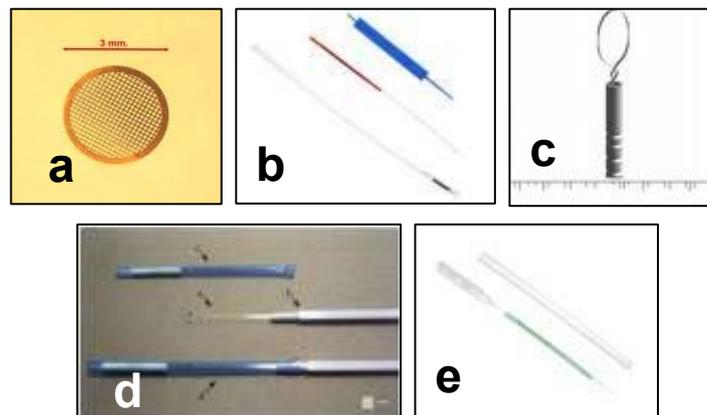


Figura 1: a) griglia per microscopia elettronica; b) pulled straw; c) cryoloop; d) cryotop; e) cryoleaf.

I valori relativi alla vitrificazione hanno fatto registrare negli anni non pochi risultati controversi. La prima nascita umana da ovociti vitrificati si è registrata nel 1999 (*Kuleshova et al., 1999*) dove il protocollo utilizzato era a base di EG 5.5M e saccarosio 1.0 M ed il supporto usato era la thin straw. Con la sostituzione

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

della thin straw con i retini della microscopia elettronica (*Wu et al., 2001; Yoon et al., 2003*) si sono registrate % di sopravvivenza e fecondazione dopo ICSI, rispettivamente pari a 69 e 72%, anche se le % di impianto rimanevano al di sotto del 10%. Riducendo l'EG a 5M ed utilizzando come supporto di vitrificazione le cryotip le % di sopravvivenza e fecondazione sono salite al 90 %, mentre quelle di impianto salgono al 18,5% (*Kuwayama et al., 2005*). Aggiungendo all'EG anche il DMSO rispettivamente nelle concentrazioni di 2.7M e 2.1M , i tassi di sopravvivenza hanno continuato ad aumentare mentre % di impianto e nati a termine restano ancora altalenanti (*Katayama et al., 2003; Kyono et al., 2005; Lucena et al., 2006; Selman et al., 2006; Antinori et al., 2006*). Nella seguente tabella sono raggruppati tutti i dati clinici ottenuti con la vitrificazione di ovociti umani al 2007 (tabella 4)

Autori	N° ovo scong.	% soprav	impianti	nascite
Kuleshova et al., 1999	17	65	1	1
Wu et al., 2001	79	59	1	0
Yoon et al., 2003	474	69	8	7
Kuwayama et al., 2003	46	94	2	2
Kuwayama et al., 2005	64	91	12	7
Kyono et al., 2005	5	100	1	1
Okimura et al., 2005	107	80	12	7
Lucena et al., 2006	159	75	13	0
Selman et al., 2006	24	75	3	0
Antinori et al., 2007	330	99	39	3

Tabella 4: dati clinici riportati dopo vitrificazione di ovociti umani (*Gook D.A. and Egdar D.H. Human reproduction 2007; 591-605*)

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

La criopreservazione dei gameti femminili presenta notevoli difficoltà tecniche se paragonata a quella dei gameti maschili o degli embrioni. Questo è dato dalle peculiarità dell' ovocita, quali la zona pellucida, i granuli corticali, il fuso meiotico, l'assetto cromosomico, il citoscheletro, che potrebbero maggiormente risentire dei bruschi cambiamenti di temperatura. Studi condotti, al fine di valutare i danni biologici indotti dal congelamento, hanno riguardato in primis l'organizzazione del fuso meiotico. E' stato dimostrato che nel topo, la struttura alterata del fuso meiotico dovuta al congelamento, veniva recuperata dopo un'ora di coltura post scongelamento a 37°C, (*Piecking and Johnson et al., 1987*), anche se nel bovino i danni rimanevano irreversibili (*Aman et al., 1994*). Non solo le basse temperature, ma anche grosse concentrazioni di crioprotettivi hanno effetti depolimerizzanti sul fuso meiotico, ma il loro effetto combinato sembra essere addirittura protettivo contro la depolimerizzazione sia nel topo che nell'uomo (*Van Der Elst et al., 1998; Gook et al., 1993*). E' stato visto che allo scongelamento di ovociti umani congelati con protocollo lento, il fuso meiotico era completamente depolimerizzato, mentre si riorganizzava perfettamente dopo 3 ore di incubazione a 37°C di coltura nella maggior parte degli ovociti maturi (*Rienzi et al., 2004; Bianchi et al., 2005*). Inoltre è stato confermato (*Cobo et al., 2001*) che i tassi di aneuploidie registrati in embrioni ottenuti da ovociti congelati/scongelati con metodica lenta, sembrano essere del tutto paragonabili a quelli ottenuti a partire da ovociti freschi (rispettivamente

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

26.8% e 26%). L'utilizzo di saccarosio 0,3M saccarosio, invece che 0,1M saccarosio, ha determinato un miglioramento nelle rese percentuali di ovociti con fuso normale, passando dal 50% (0,1Msaccarosio) al 70% (0,3 M saccarosio), valore questo molto vicino a quello registrato negli ovociti freschi (73%) (*Coticchio et al., 2006*). Sembrerebbe inoltre che la vitrificazione sia meno dannosa e traumatica per il fuso meiotico rispetto al protocollo di congelamento lento (*Gardner et al., 2007*) infatti dopo 3 ore di incubazione post scongelamento, verrebbe di nuovo assemblato un corretto fuso (*Cobo et al., 2008*). Studi condotti nel bovino hanno dimostrato che il protocollo di vitrificazione che utilizza sia le OPS che i Cryotops, riduce i danni al fuso incidendo positivamente sull'assetto cromosomico (*Morato et al., 2008*).

Tra i possibili target di danni sub-letali sono stati riportati : la riduzione dei granuli corticali (GC) nell'uomo e nel topo (*Al-Hasani and Diedrich, 1995*); l'indurimento della zona pellucida ovvero, l'hardening, rendendo impossibile la penetrazione spermatica nel topo (*Matson et al., 1997*), dovuta probabilmente ad una esocitosi prematura dei GC innescata da uno dei crioprotettivi utilizzati ovvero il DMSO (*Vincent et al., 1990*). I dati riportati in letteratura riguardanti l'esocitosi dei granuli restano per adesso discordanti. Infatti sebbene alcuni lavori su uomo e topo non abbiano fatto registrare variazioni nel numero dei granuli corticali (*Van Blerkom et al., 1994; Jones et a., 2004; Li et al., 2005*), protocolli di congelamento lento che differivano per diverse concentrazioni di saccarosio hanno fatto registrare notevoli variazioni del loro numero

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

(Ghetler et al., 2006; Nottola et al., 2007; Gualtieri et al., 2008). L'esocitosi dei granuli è un evento innescato alla fecondazione da un rilascio di calcio dai siti intracellulari di immagazzinamento. Più specificamente nei mammiferi alla fecondazione si assiste ad una serie di transienti di calcio. Lo spermatozoo infatti, innesca l'idrolisi del fosfatidilinositolo presente a livello dell'oolemma, con conseguente rilascio intracellulare di inositolo trifosfato (IP₃). L'IP₃ è in grado di indurre un rilascio di ioni calcio (Ca⁺⁺), che a sua volta innesca l'esocitosi dei GC. Tali elevazioni di calcio, agiscono poi come secondi messaggeri in una serie di pathways che rientrano nell'attivazione ovocitaria e nello sviluppo embrionale, regolando la progressione del ciclo cellulare (Malcuit et al., 2006; Whitaker et al., 2006). Infatti si assiste ad una ripresa della meiosi dalla metafase II, ad una progressione del ciclo cellulare e ad un reclutamento degli mRNA materni capaci a questo punto di sintetizzare prematuramente determinate proteine (Kline and Kline 1992; Shwan and Ozil, 1994; Dulcibella et al., 2002). E' stato a tal proposito dimostrato che alterazioni sperimentali della corretta successione delle oscillazioni di calcio possano danneggiare il corretto sviluppo pre e post-impianto nel modello murino (Ozil and Huneau, 2001). Quindi una riduzione nella densità dei granuli corticali potrebbe essere spiegata con un rilascio prematuro di calcio, il quale andrebbe ad attivare sempre prematuramente tutta una serie di eventi che di norma si osservano alla fecondazione, spiegando così le ripercussioni negative che si hanno in termini di competenza allo sviluppo embrionale. Ad avvalorare la

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

nostra tesi vi è il lavoro di Jones che riporta una ridotta capacità da parte di ovociti umani congelati, di rispondere allo ionoforo A23187 (*Jones et al., 2004*). Infatti in ovociti congelati con protocollo lento a base di Pr-Oh 1.5M e saccarosio 0,2M, la capacità di risposta all'indicatore si riduceva di circa otto volte. In realtà ci sarebbe la possibilità che sia lo stesso crioprotettivo, il propandiolo, ad indurre un aumento di calcio, avviando l'ovocita verso un'attivazione prematura (*Larman et al., 2007*). Il crioprotettivo riuscirebbe in effetti a veicolare passivamente lo ione dal mezzo esterno, difatti la rimozione del calcio dalle soluzioni di congelamento riduce l'aumento di calcio intracellulare. Anche L'EG ed il DMSO inducono un aumento dei livelli di calcio, tanto da indurre l'hardening della zona pellucida (*Larman et al., 2006*), ma questo avviene in modo differente a seconda del crioprotettivo. Infatti gli effetti registrati in presenza di DMSO sono per lo più comparabili sia in presenza che in assenza di calcio dal mezzo esterno, mentre per l'EG le oscillazioni da calcio diminuiscono sottraendo il calcio dalle soluzioni di congelamento. Ciò significa che il DMSO agisce solo e direttamente sui siti interni di immagazzinamento di calcio come il reticolo endoplasmatico; l'EG invece veicola in modo passivo il calcio dall'esterno (*Larman et al., 2006 Gardner et al., 2007*). Pertanto l'utilizzo di soluzioni di congelamento calcium free dovrebbe ridurre le premature escursioni di calcio, senza però pregiudicare i tassi di sviluppo embrionale.

Altro "marker" considerato come possibile responsabile di un ridotto sviluppo embrionale è rappresentato dai mitocondri.

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

Infatti nel lavoro di *Jones del 2004* è emerso che il 100% di ovociti congelati/scongelati con protocollo lento a base di PrOH presentava mitocondri pericorticali disfunzionali.

Studi sul proteoma di ovociti MII di topo hanno dimostrato un alterazione del profilo proteico in ovociti congelati con protocollo lento, mentre l'uso di EG e DMSO nel protocollo di vitrificazione dava un profilo proteico molto simile a quello riscontrato in ovociti freschi (*Gardner et al., 2007*). Valori di espressione proteica simili ai freschi si sono ottenuti anche in ovociti vitrificati senza calcio, mettendo in evidenza come alcune proteine invece possano essere “up-regulated” e “down-regulated” dopo congelamento lento indipendentemente dalla presenza o meno di calcio (*Larman et al., 2007*). Oltre a danni funzionali, sembrerebbe che il congelamento induca anche un danno ultrastrutturale negli ovociti congelati con protocollo lento a carico dell'oolemma, dei microvilli, dei mitocondri, dei GC e dei filamenti intermedi; danni questi che sembrerebbero essere più ridotti in ovociti vitrificati con EG (*Valojerti and Salehnia, 2005*). Effetti dell'EG nel congelamento lento sono stati altresì condotti su ovociti umani, e quello che è emerso è una riduzione nel numero dei GC, una disorganizzazione degli aggregati cisterne tubulari di reticolo e mitocondri, oltre a presenza di vacuoli, lisosomi e assenza di microvilli (*Nottola et al., 2008*). Sempre per quanto riguarda il congelamento lento, anche il propandiolo usato a 1,5M fa registrare gli stessi danni ultrastrutturali riscontrati dopo l'utilizzo dell'EG. Pertanto sono totalmente da escludere eventuali danni al DNA ed eventi

PARTE I: criopreservazione ovocitaria

apoptotici (*Gualtieri et al.,2008*) in ovociti post-scongelo.

PARTE II

CRIOPRESERVAZIONE DEL TESSUTO OVARICO

Oggi giorno, la crioconservazione del tessuto ovarico rappresenta una delle strategie più ambiziose nel tentativo di preservare la fertilità in donne con certe patologie in grado col tempo di distruggere e compromettere la funzionalità ovarica e la riserva follicolare e quindi di compromettere le possibilità riproduttive. La maggior parte delle donne raggiunge la menopausa intorno ai 50-60 anni d'età. Purtroppo però circa l'1% va incontro a prematura menopausa in un'età al di sotto dei quaranta anni (*Coulam et al. 1986, Riboli et al 2002; Goswamy and Conway 2005*). Tra questi numerosi casi, la prematura degenerazione ovarica (POF) ha delle origini genetiche, mentre la normale età di menopausa è maggiormente ereditata dalle gemelle omozigote che dalle dizigoti (*De Bruin et al.2001; Van Asselt et al.2004*).

Questa è la procedura più vantaggiosa ed eticamente meno problematica: è applicabile anche nel caso di pazienti in età pediatrica e non presuppone alcuna stimolazione ormonale dell'ovaio.

In tale metodica possono essere crioconservati in situ, centinaia di follicoli primordiali contenenti oociti immaturi, che risultano molto resistenti ai processi di congelamento e scongelamento, (*Rutheford and Gosden, 1999*). Nel corso degli anni le tecniche di crioconservazione hanno prodotto risultati sempre più incoraggianti: le percentuali di sopravvivenza dei follicoli dopo scongelamento vanno dal 33 all' 80% negli animali (*Carroll*

PARTE II: criopreservazione del tessuto ovarico

1990; Gosden 1994; Candy 1995; Cortvrindt 1996) e dal 72% al 94% nell'uomo (Newton 1996; Hovatta 1996; Fabbri 2003). Nel 2006 il gruppo della Dott.ssa Fabbri ha condotto uno studio volto a valutare la preservazione del tessuto ovarico umano crioconservato utilizzando soluzioni di congelamento con differenti supporti proteici: Fetal Calf Serum (FCS), Plasmanate e Syntetic Serum Substitute (SSS). I migliori risultati in termini di vitalità follicolare sono stati ottenuti con la soluzione contenente FCS. Nello stesso anno confrontando gli effetti dell'FCS e del siero umano (HS) a diverse concentrazioni nelle procedure di congelamento e scongelamento è emerso che la migliore preservazione del tessuto si è avuta con soluzioni contenenti il 30% di HS (Fabbri et al.2006).

Il tessuto ovarico può essere teoricamente crioconservato utilizzando due differenti approcci: come strip di corticale ovarica o come ovaio in toto con il suo pedicello vascolare.

Crioconservazione strip di corticale ovarica

I primi esperimenti di crioconservazione di tessuto ovarico furono effettuati tra il 1950 e il 1960: frammenti di ovaio di topo furono congelati in una soluzione a base di glicerolo a -79°C (Parkers AS. 1953; Deandely R. et al. 1957; Parkers AS et al.1953). La prima gravidanza da tessuto ovarico congelato e scongelato fu ottenuta nel topo già nel 1960 (Parrot DMV et al., 1960), ma solo negli ultimi 15 anni sono stati messi a punto protocolli di congelamento/scongelamento efficienti. I risultati sono stati ottenuti infatti sul modello animale e sono stati

PARTE II: crioconservazione del tessuto ovarico

piuttosto incoraggianti, tanto che si è aperta la sperimentazione al modello umano. In letteratura è riportato che biopsie ovariche umane crioconservate in DMSO presentano allo scongelamento dei follicoli che si presentano morfologicamente normali (*Hovatta et al, 1996*). Inoltre strip scongelate e coltivate in vitro per 4-21 giorni presentavano follicoli in buono stato e in accrescimento (*Hovatta et al, 1997*). Il vantaggio tecnico senza dubbio più rilevante è la possibilità di recuperare biopsie ovariche, mediante laparoscopia indipendentemente dallo stadio del ciclo mestruale. Purtroppo se dopo il congelamento/scongelamento segue un trapianto avascolare il tessuto trapiantato sarà completamente dipendente da una nuova rivascularizzazione, e di contro un gran numero di follicoli verrebbe perso durante una prima fase di ischemia che si verrebbe a manifestare (*Liu et al, 2002*).

Crioconservazione ovaio in toto

il primo successo ottenuto da trapianto di ovaio in toto risale al 2002, quando il team di Wang riuscì a ripristinare la funzione riproduttiva nel 60% di topi sottoposti a congelamento dell'ovaio e delle vie riproduttive e successivo (*Wang et al., 2002; Yin et al, 2003*). Tale metodica risulta essere ancora una sfida molto ardua, in quanto l'ovaio della maggior parte degli animali si presenta di una certa taglia, quindi così come per l'ovocita, la permeabilità dei crioprotettivi ed un'equa diffusione degli stessi rappresenta una delle principali limitazioni. Nonostante tutto studi effettuati nella pecora , hanno dato risultati incoraggianti. Il 38% di animali a cui

PARTE II: criopreservazione del tessuto ovarico

veniva trapiantato l'intero ovaio post congelamento-scongelo ripristinava una regolare attività endocrina dopo circa 36 mesi dall'intervento. Inoltre 6 ovociti recuperati e avviati ad una divisione partenogenetica hanno raggiunto lo stadio ad embrione ad 8 cellule (*Arav et al, 2005*). Sebbene il congelamento dell'ovaio in toto trova molte difficoltà a causa di problemi tecnici, è anche vero che essa è più vantaggiosa rispetto al congelamento della strip in quanto al momento del trapianto si ha un immediato approvvigionamento di sangue, riducendo al minimo gli effetti del danno ischemico.

PERCHE' CRIOPRESERVARE FRAMMENTI DI TESSUTO OVARICO

Le situazioni in cui risulta essere utile ricorrere alla criopreservazione del tessuto ovarico sono le seguenti:

1. Rischio di ovariectomia bilaterale effettuata come trattamento nel caso di cisti ovariche benigne.
2. Storia familiare di esaurimento ovarico precoce in pazienti in cui la madre è andata incontro a menopausa prima dei 40 anni e che corrono un rischio aumentato di prematuro esaurimento della funzione ovarica, patologia questa che può sopraggiungere anche intorno ai 30 anni .
3. Pazienti affette da neoplasie: dal momento che le nuove strategie antitumorali hanno portato un aumento della sopravvivenza delle bambine affette da leucemie, linfomi, tumori alla mammella. A questo punto le ricerche sono volte

PARTE II: criopreservazione del tessuto ovarico

verso il futuro e quindi su quelle che sono le conseguenze da affrontare dopo la guarigione. Si è stimato che nel XXI secolo circa 1 adulto su 1000 all'età di trent'anni sarà sopravvissuto ad un tumore in età pediatrica (*Bath LE; 2002*). Purtroppo in questi casi non si ha a che fare con tessuti a rapida proliferazione, ma va ricordato che il numero di cellule germinali è predeterminato fin dalla nascita e da quel momento in poi sono destinati solo a diminuire.

LA FERTILITA' IN PAZIENTI ONCOLOGICHE

La radio e la chemio terapia possono avere effetti diversi a seconda del tessuto che colpiscono. Per i tessuti a rapida riproduzione, quali midollo osseo, intestino, il danno citotossico è reversibile, mentre per il tessuto ovarico in cui il numero di cellule germinali è predeterminato alla nascita, è progressivo e irreversibile. I trattamenti oncosoppressivi sono capaci di indurre oligo/amenorrea fino ad una menopausa precoce. Tali terapie distruggono la riserva ovocitaria delle pazienti in relazione anche alla loro età, dal tipo di trattamento e dalla dose di medicinali o radiazioni somministrate (*Meirow, 2000*) . Infatti nella donna, il numero di cellule germinali è fisso alla nascita e nel tempo non può che diminuire. Durante l'età puerile il numero di follicoli è pari a circa 300.000, fino a ridursi in età adulta a circa 400 con l'avvento della menopausa. L'amenorrea si verifica in una percentuale compresa fra il 20 e il 70% dei casi per donne di età inferiore a 40 anni e nel 50-100% dei casi per donne di età maggiore.

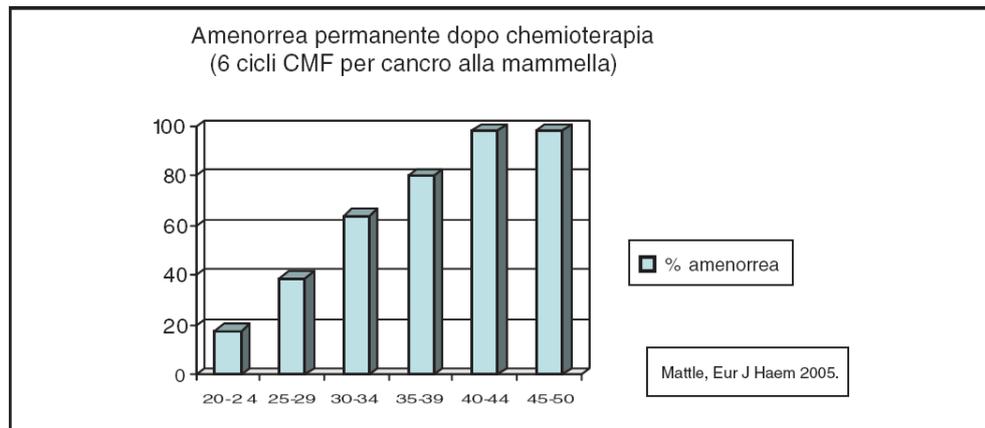


Grafico 1: Mattle, Eur. Journal Haem, 2005

I farmaci antineoplastici che più frequentemente possono indurre tossicità gonadica sono gli agenti alchilanti (ciclofosfamide, clorambucil, ifosfamide, mostarde azotate, procarbazine) e le nitrosouree (carmustina, lomustina). Il farmaco con maggiori effetti dannosi è la ciclofosamide (*Kenney et al., 2001*). Di fatto, attualmente il 69% di pazienti in età fertile sottoposte ad una terapia con CMF (ciclofosfamide, methotrexate e 5-fluorouracile) manifesta amenorrea (*Bines et al., 1996*), in relazione al 9% di pazienti affette dalla stessa patologia dopo trattamento con soltanto methotrexate e 5-fluorouracile (Tab. 5).

Invece, tutti i chemioterapici sono altamente tossici per la funzione gonadica maschile in quanto interferiscono con la continua funzione cellulare che caratterizza la spermatogenesi.

PARTE II: criopreservazione del tessuto ovarico

Rischio alto	Rischio intermedio	Rischio basso
Ciclofosfamide	Cisplatino	Methotrexate
Clorambucil	Adriamicina	5-fluoracile
Melfalan		Vincristina
Busalfan		Actinomicina C
Procarbazina		Bleomicina
Mostarde azotate		

Tabella5: Rischio di fallimento ovarico in rapporto al farmaco usato

Al pari della chemioterapia, il danno ovarico indotto da radiazioni è condizionato da tre principali fattori di rischio: età della paziente, dose delle irradiazioni e sede della loro somministrazione.

Donne con età superiore ai 40 anni possiedono un pool di oociti limitato e dunque l'esposizione a radiazioni nell'ordine di 5-6 Gy sono sufficienti a produrre un danno permanente; di contro, pazienti con età inferiore ai 40 anni evidenziano una resistenza al danno anche a dosi nell'ordine dei 20 Gy (*Meirow and Nugent, 2001; Thompson et al, 2002*).

E' tuttavia necessario sottolineare che, sebbene pazienti giovani (età < 35 anni) mostrano, nella maggior parte dei casi, il recupero di un normale ciclo mestruale, esse sono ancora soggette al rischio di infertilità e menopausa precoce ed anche in tal caso esiste una relazione dose-dipendente. Infatti, trattamenti con dosi di 20-35 Gy risultano in un tasso di infertilità pari al 22%, mentre dosi >35 Gy in un tasso pari al 32%. L'ultimo parametro capace di influenzare la fertilità è la sede di somministrazione delle radiazioni. Si evince un danno al sistema riproduttivo quando la paziente è sottoposta a TBI (Total Body Irradiation), ad irradiazione diretta dell'area

PARTE II: criopreservazione del tessuto ovarico

pelvica ed, in ultimo, ad irradiazione della ghiandola pituitaria, sede di produzione degli ormoni.

La TBI è associata con una percentuale di fallimento gonadico permanente pari al 90% e con una incidenza di gravidanza inferiore al 3%. Tuttavia, tra donne sottoposte a TBI prima della pubertà si evidenzia una prospettiva di recupero maggiormente favorevole, in particolare se le radiazioni sono somministrate in diverse frazioni (*Wallace and Thompson, 2003*).

Come per la TBI, anche l'irradiazione diretta dell'area pelvica causa infertilità e aborto spontaneo (~ 38% a paragone del 12% della popolazione generale). In particolare, irradiazioni della porzione addominale determinano un significativo decremento del volume uterino (> 40% della normale dimensione di un individuo adulto) e cambi irreversibili nella muscolatura dell'utero stesso e nel flusso sanguigno (*Critchley, 1999*). Teoricamente, queste variazioni determinano un'inadeguata placentazione, un processo dipendente da un adeguato apporto sanguigno ed ormonale.

I POSSIBILI IMPIEGHI DEL TESSUTO OVARICO UMANO

Teoricamente, i possibili impieghi del tessuto ovarico umano per lo sviluppo dei follicoli immaturi sono: autotrapianto, xenotrapianto e isolamento dei follicoli primordiali e loro maturazione in vitro (*Kim et al, 2001*).

Trapianto di tessuto ovarico: autotrapianto

E' una metodica relativamente pratica ed accettabile nella clinica medica con limitati problemi di natura tecnica ed etica. L'autotrapianto sembra essere in grado di ristabilire la funzione endocrina endocrina (*Callejo et al, 2001; Radford et al, 2001*) dell'ovaio, oltre a quella della fertilità (*Donnez et al, 2004*). Il tessuto ovarico ha una duplice possibilità di reimpianto: ortotopicamente ed eterotopicamente, ma ad oggi non si sa ancora quale strategia sia da preferire.

> Reimpianto ortotopico: il tessuto ovarico viene reimpiantato nella sua posizione anatomica per via laparoscopica, permettendo la ripresa della funzione gametogenica e steroidogenica: in questo caso il concepimento può avvenire naturalmente anche se un limite viene posto dalla scarsa rivascolarizzazione della fossetta ovarica. Dati recenti sono stati registrati dal gruppo di Donnez, il quale ha ottenuto, dopo 5 mesi dal reimpianto di frammenti ovarici criopreservati, la prima gravidanza in una giovane donna, sottoposta a chemioterapia per linfoma di Hodking (*Donnez et al, 2004*).

> Reimpianto eterotopico: il tessuto ovarico viene impiantato in siti particolarmente vascolarizzati; in questo caso gli ovociti

PARTE II: criopreservazione del tessuto ovarico

maturi recuperati possono essere fertilizzati in vitro (IVF) al fine di ottenere gravidanze. Questo tipo di reimpianto ha dei vantaggi in quanto non è nota la longevità dei trapianti ovarici; per cui per evitare procedure invasive e ottenere un facile recupero degli ovociti potrebbe essere conveniente usare siti eterotopici. Tuttavia la metodica, apparentemente più semplice dell'ortotopica, incontra delle difficoltà nel riuscire ad ottenere ovociti vitali da poter essere utilizzati nelle procedure di IVF. In letteratura è riportato il normale ripristino della funzione ovarica da strips di tessuto reimpiantate nello spazio sottocutaneo dell'avambraccio (*Oktaç et al 2001*). Lo stesso team circa 3 anni dopo riusciva a recuperare 20 ovociti dal tessuto ovarico impiantato al di sotto della cute del basso addome in una donna affetta da cancro al seno. Tali ovociti però nonostante siano stati fecondati in vitro non hanno mai ottenuto gravidanze (*Oktaç et al, 2004*).

I rischi dell'autotrapianto

Non bisogna dimenticare che in caso di autotrapianto sia esso orto che eterotropico, il rischio di reimportare in pazienti oncologiche cellule neoplastiche è molto alto. Anche se le tecniche biomolecolari disponibili per l'identificazione di cellule tumorali residue (PCR o FISH), nel caso di alcune neoplasie, come le leucemie, il rischio di portarsi dietro cellule tumorali non può essere evitato (*Kurokawa T, 1996*). Per minimizzare il rischio del trapianto ex novo di cellule tumorali sono state messe a punto delle tecniche da considerarsi però per adesso ancora in fase sperimentale: xenotrapianto; crescita

PARTE II: criopreservazione del tessuto ovarico

follicolare ed ovulazione in vitro; tecniche di nuclear transfer: (Liu H. 1999; Moffa F, 2002). Queste tecniche non hanno trovato ancora applicazione e al contempo non sono state ben accette dal mondo etico, religioso.

Trapianto di tessuto ovarico: xenotrapianto

Tale metodica prevede il trapianto di tessuto ovarico in un individuo ricevente, in genere topi con SCDI (Severe Combined ImmunoDeficiency). Gli organismi riceventi presentano una mutazione sul cromosoma 16, danneggiando il processo di differenziamento dei linfociti T e B, in modo da sopprimere la normale risposta immunitaria dell'individuo. Ciò quindi annulla il rischio di rigetto del tessuto estraneo dopo trapianto (Bosma et al, 1989). I topi così modificati, riescono a supportare lo sviluppo follicolare fino allo stadio antrale di tessuto ovarico da gatti, pecore, scimmie e donne (Bosch et al, 2004; Wolvekamp et al, 2001). Il vantaggio fondamentale di questa tecnica è di eliminare il rischio di reimpianto di cellule neoplastiche indotto dall'autotrapianto. Nonostante tutto lo xenotrapianto nell'uomo è ancora lontano dall'applicabilità clinica, in quanto vi è la possibilità di trasmissione di zoonosi dall'animale all'uomo, oltre al fatto che tale tecnica si trascina dietro problemi di natura etica (Paris et al., 2004). Inoltre negli ovociti ottenuti da xenotrapianto è stata riscontrata una certa disorganizzazione nell'assetto cromatinico e dei microtubuli (Kim et al., 2002; Gook et al., 2005).

Isolamento follicoli: crescita e maturazione in vitro

Sembrerebbe essere questa la metodica alternativa ai vari tipi di reimpianto, in quanto azzerava completamente il rischio di metastasi e di danno ischemico dovuto al trapianto. La prima tappa consiste nell'isolare meccanicamente o enzimaticamente follicoli dalla corticale ovarica e la loro successiva maturazione in vitro. Il problema da affrontare sta proprio nel fatto che i follicoli che si ritrovano nella corticale ovarica sono primordiali, i quali se da un lato hanno piccole dimensioni tali da semplificare il processo di congelamento, dall'altro lato riuscirli a maturare in vitro è un'impresa estremamente difficile, in quanto poco si sa in merito (*Gougeon, 1996*). Nel topo è stata sperimentata una valida strategia che vede la coltura del tessuto ovarico per 8 giorni, tempo in cui i follicoli cominciano ad accrescersi. Ed è solo allora che i follicoli vengono isolati e il loro sviluppo continuato in vitro fino allo stadio di follicoli antrali (*Eppig and O'Brien, 1996*). A quanto pare questa risulterebbe la migliore e potenziale strategia per recuperare ovociti da follicoli congelati.

STRATEGIA INNOVATIVA PER PRESERVARE LA FERTILITA': ISOLAMENTO E VITRIFICAZIONE DI FOLLICOLI

La metodica è dei giorni nostri e prevede l'isolamento dei follicoli dalla corticale ovarica permettendo una maturazione in vitro o un successivo trapianto. In questo modo sarebbe possibile visualizzare la qualità, il numero e lo stadio dei

PARTE II: crioconservazione del tessuto ovarico

follicoli isolati, che si riflette vantaggiosamente sulla coltura o sul trapianto. La dimensione piuttosto contenuta dei follicoli permette di crioconservarli facilmente e favorisce al contempo la loro futura angiogenesi. Intanto il rischio di trasmissione di metastasi si annulla completamente dal momento che le cellule tumorali non possono oltrepassare la lamina basale (*Motta et al, 2003; Rodgers et al, 2003*), a differenza di quanto accade per i tessuti congelati e reimpiantati, dove al momento dell'analisi istologica effettuata prima del congelamento non vi era la presenza di cellule neoplastiche, che però si presentavano allo scongelamento (*Meirow et al., 2008*). I follicoli possono essere isolati meccanicamente ed enzimaticamente. Il primo è eseguito con aghi da dissezione al fine di recuperare i follicoli; tale metodica però, pur preservando l'integrità follicolare, non è molto adatta per il recupero dei follicoli primordiali e primari. Il secondo invece è più semplice e rapido, anche se l'attività enzimatica potrebbe indurre la degradazione della lamina basale e delle componenti follicolari. Non esiste ancora una tecnica affidata e affermata per l'isolamento enzimatico, ma in letteratura è spesso riportato l'utilizzo della Collagenasi di tipo I prodotta da *Clostridium histolyticum* (*Hovatta et al, 1999; Donnez et al, 2008*). Le collagenasi sono capaci di degradare il collagene nativo che mantiene uniti i tessuti animali, vengono sintetizzati da vari microrganismi e cellule animali. I problemi riscontrati in questa metodica, riguardano, come già accennato, la difficoltà della maturazione in vitro, oltre al fatto che coltivati in un sistema bidimensionale i follicoli tendono ad aderire al substrato con conseguente distacco delle cellule somatiche

PARTE II: criopreservazione del tessuto ovarico

dell'ovocita. In tal modo si distruggono le interazioni follicolo-ovocita necessarie per la sopravvivenza e la crescita follicolare (*Eppig JJ et al., 2005*). Dopo l'isolamento, si sta valutando la possibilità di crioconservare i follicoli isolati, per poi reimpiantarli al momento della remissione completa della malattia. La vitrificazione è una tecnica di raffreddamento ultrarapido. Le cellule o i tessuti sono preventivamente esposti a soluzioni caratterizzate da un'elevata concentrazione di crioprotettori (6M) – penetranti e non penetranti- e poi ad un abbassamento rapidissimo della temperatura per immersione diretta in azoto liquido. Le soluzioni passano dunque, ad uno stato solido, come vitreo, in assenza di una formazione cristallina (*Fahy, 1986*). Questo stato mantiene la distribuzione ionica e molecolare dello stato liquido normale e può essere paragonato a quello di un liquido molto viscoso.

SCOPO

La criopreservazione di ovociti e di tessuto ovarico deve essere vista come un grande passo in avanti nello sviluppo delle tecniche di PMA. Ciò, da un lato, assicurerebbe una potenziale fertilità nelle donne e dall'altro farebbe superare tutte quelle questioni etico-legali che si sono sollevate allorquando si è cominciato a congelare embrioni ed ovociti fecondati.

L'ovocita è una cellula molto complessa che porta racchiuso in se un elegante progetto che si realizza nel tempo fino a portare alla formazione di un nuovo individuo e all'inizio di una nuova vita. Ed è proprio a causa della sua complessità che l'ovocita umano risulta essere particolarmente sensibile alla criopreservazione. La formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari, la tossicità dei crioprotettori, lo stress osmotico, la temperatura sotto zero decisamente non fisiologica, l'instabilità del pH, la generazione di specie reattive di ossigeno (ROS) sono tutti fattori che influiscono sulla viabilità ovocitaria (*Fuller B. and Payntner, 2004*). Nonostante la prima gravidanza ottenuta dopo trasferimento embrionale a partire da ovociti criopreservati risalga a circa 20 anni fa (*Chen C. 1986*), secondo un'indagine condotta da Nicole Noyes della New York University School of medicine, dal 1986 ad oggi sarebbero all'incirca 936 i bambini venuti al mondo da ovociti congelati e dei quali 350 solo in Italia. Il protocollo di criopreservazione "slow freezing-rapid thawing" maggiormente utilizzato ha un esito clinico estremamente limitato. Infatti, solo circa 1.5 ovociti su 100 congelati esitano in nascite a termine e le percentuali di interruzione spontanea della gravidanza dopo trasferimento di

embrioni prodotti da ovociti criopreservati, restano anormalmente elevate. Questi dati lasciano supporre che i processi cellulari e molecolari dell'ovocita responsabili della competenza allo sviluppo e quindi della capacità dell'embrione di superare fasi critiche, quali lo stadio ad 8 cellule, di attecchire all'endometrio e di esitare in nascite a termine siano danneggiati dalla procedura di congelamento-scongelo.

Scopo della presente tesi di Dottorato di Ricerca è stato quello di:

1) evidenziare quali processi cellulari e molecolari possano essere alterati nell'ovocita umano criopreservato comparando diversi protocolli di criopreservazione e valutandone vantaggi e svantaggi sotto l'aspetto biologico ed etico;

2) acquisire informazioni di base sulla criopreservazione del tessuto ovarico ed esplorare diverse metodiche di criopreservazione di frammenti di corticale ovarica e di isolamento di follicoli ovarici utilizzando la specie bovina quale modello animale e materiale biologico umano.

Il mio progetto si è quindi articolato su due livelli: uno di approfondimento bibliografico; l'altro sperimentale. La parte sperimentale è stata resa possibile grazie alla donazione di ovociti umani freschi soprannumerari dietro consenso informato, da pazienti coinvolte in cicli di fecondazione assistita presso il Centro Mediterraneo di Fecondazione Assistita (Dott.ssa Iaccarino, Clinica Mediterranea, Napoli), mentre frammenti di tessuto ovarico umano sono stati donati previo consenso informato, da pazienti, con differenti patologie sottoposte ad ablazione parziale o totale delle ovaie mediante

laparoscopia presso l'unità Operativa di fisiopatologia della Riproduzione Sterilità di Coppia, Ospedale San Giuseppe Moscati di Avellino (responsabile Prof. R. Talevi). Vista però la rarità con cui sono stati ottenuti pezzi di ovaio umano, alcuni protocolli sono stati messi a punto utilizzando come modello il bovino.

Gli ovociti sono stati congelati/scongelati con metodiche diverse:

1. congelamento lento/scongelamento rapido;
2. vitrificazione.

Successivamente ne è stata osservata:

- a) l'ultrastruttura mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM);
- b) la percentuale di incremento di calcio ionico intracellulare dopo trattamento con lo ionoforo A23187.

Negli ovociti congelati/scongelati con protocollo lento sono stati inoltre valutati:

- a) l'incidenza della frammentazione del DNA;
- b) l'incidenza dell'apoptosi caspasi-dipendente;
- c) il potenziale dei mitocondri.

Negli ovociti freschi sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- a) l'analisi ultrastrutturale al microscopio elettronico a trasmissione;
- b) gli incrementi dei livelli di calcio ionico intracellulare in risposta allo ionoforo A23187;
- c) gli incrementi dei livelli di calcio ionico intracellulare in risposta a soluzioni di congelamento (equilibrato e

vitrificazione) utilizzati comunemente nei protocolli di vitrificazione;

d) gli incrementi dei livelli di calcio ionico intracellulare in risposta a singoli crioprotettivi utilizzati nella tecnica di congelamento lento e vitrificazione.

Generalmente il congelamento ovocitario induce un'esocitosi dei granuli corticali che è strettamente correlata ad aumenti di calcio intracellulare (*Gualtieri et al., 2008*). Pertanto le analisi dei livelli di calcio in ovociti freschi durante l'esposizione ai crioprotettivi sono state condotte per comprendere se l'esocitosi dei granuli corticali possa essere dovuta ad un incremento prematuro di ioni calcio indotto dai crioprotettivi stessi.

Per quanto concerne il tessuto ovarico, frammenti dello stesso sono stati congelati/scongelati con protocolli e metodi diversi:

1. congelamento lento/scongelamento rapido in presenza ed in assenza di colina;

2. vitrificazione in presenza ed in assenza di colina.

Dopodichè ne è stata valutata:

a) la morfologia da un punto di vista istologico e ultrastrutturale.

Tali parametri sono stati poi confrontati con quelli analizzati per il tessuto fresco. Inoltre, considerato il rischio di reimmissione di cellule tumorali comportato dal reimpianto di tessuto ovarico congelato/scongelato, si è cercato di mettere a punto un protocollo specifico per l'isolamento dei follicoli. Una volta isolati, i follicoli sono stati vitrificati/scongelati e coltivati in vitro; la loro morfologia, sopravvivenza, ed accrescimento sono stati monitorati nel tempo.

“OVOCITI”

MATERIALI E METODI

MATERIALE E METODI

1. Prelievo degli ovociti

Ovociti allo stadio di metafase II sono stati ottenuti previo consenso informato da circa 40 pazienti sottoposte a cicli IVF da Marzo 2007 a Settembre 2009 per cause di infertilità dovute a fattori maschili o fattori tubarici presso la clinica Mediterranea di Napoli. Le pazienti vengono trattate con analoghi del GnRH (Enantone Die; Takeda, Catania, Italy) a partire dal 21° giorno del ciclo fino al giorno della somministrazione di hCG (human chorionic gonadotrophin). Per ottenere una crescita follicolare multipla alle pazienti sono state somministrate 75IU di FSH ricombinante (Gonal-F 75IU, Serono, Roma) fino al giorno che precede la somministrazione di HCG. Lo sviluppo follicolare viene monitorato ecograficamente e mediante saggi ormonali di estradiolo (E2). Quando erano presenti almeno due follicoli con un diametro superiore o uguale ai 18 mm era indotta la maturazione con circa 10.000IU di HCG (gonasi HP 5000 IU Amsa srl, Roma Italia). Il prelievo ovocitario veniva eseguito, previa anestesia generale, mediante ago ecoguidato per via transvaginale, 35 ore dopo somministrazione di HCG. I complessi ovocita-cumulo ooforo (COC) venivano trasferiti in terreno G-FERT (vitrolife, Gothenburg, Sweden) ed incubati a 37°C, 5% CO₂ in aria. Gli ovociti venivano denudati dalle cellule del cumulo ooforo mediante azione enzimatica (ialuronidasi 20 UI/ml sigma Aldrich srl, Milano) e meccanica (flexipipette Cook). Mediante l'ausilio di un microscopio invertito nikon TE 2000, gli ovociti

venivano osservati in modulazione di contrasto secondo Hoffmann, e solo quelli che non presentavano dimorfismi vari venivano trasferiti per qualche ora in gocce da 20 microlitri di Quinn's Advantage Protein Plus Cleavage Medium (*Sage, Biopharma, BedministerNJ*), ricoperte da olio minerale ed incubate a 37°C in presenza del 5%CO₂. Gli ovociti sovrannumerari venivano poi processati entro 2 ore dal prelievo, ed allocati in maniera random, per gli studi di microscopia elettronica, saggi in fluorescenza e per la criopreservazione (congelamento lento; vitrificazione).

2. Protocollo di congelamento lento

Il protocollo di congelamento lento scongelamento rapido, preso in considerazione prevede l'utilizzo di propandiolo come crioprotettivo interno (1,2Pr-OH) ad una concentrazione di 1.5M e saccarosio 0.3M come crioprotettivo esterno (*Fabrizi 2001*). Sono stati recuperati all'incirca 123 ovociti, da pazienti di età compresa tra i 29-40 anni sottoposte a cicli di IVF. Tutte le soluzioni sono state preparate con Dulbecco's PBS (DPBS) (GIBCO, Life Technologies, UK) supplementato con serum protein supplement (SPS; Medicult, Firenze, Italia) con PrOH (Fluka chimica Sigma Aldrich). Gli ovociti sono stati equilibrati per 10 minuti in una soluzione al 20% di SPS, 1.5M propandiolo in DPBS. Successivamente trasferiti in 0,8 ml di DPBS supplementato col 20% di SPS, 1.5M Pr-OH, e 0,3 M saccarosio dove vi rimanevano per 5 minuti. Un numero massimo di 4

ovociti sono stati caricati in una straw di plastica, la quale è stata trasferita in un congelatore biologico verticale cryo Med Freezer (Thermo Forma). La prima discesa di temperatura è stata condotta da 20°C a -8°C con una velocità di raffreddamento di -2°C/min. Successivamente la temperatura è stata mantenuta a -8°C per circa 10 minuti per indurre la nucleazione del ghiaccio (seeding). Le straws sono state lentamente congelate a -30°C con una velocità di -0,3°C/min, poi velocemente a -150°C/min con una velocità di -50°C/min prima di essere poi trasferite in azoto liquido, ovvero a -196°C. Per lo scongelamento le straws sono state tenute per 30 secondi a temperatura ambiente in aria e poi trasferite in acqua a 30°C per 40 secondi. Una volta recuperati dalle straws, gli ovociti sono stati trasferiti in 0,5ml di soluzione di contenente PROH 1 M e saccarosio 0.3M per 5 minuti. I passaggi successivi sono stati fatti in soluzioni contenenti una concentrazione decrescente di propandiolo (0,5 M; 0 M), con aggiunta di saccarosio 0,3 M. L'ultimo passaggio è stato fatto in DPBS supplementato con SPS 20%, 10 minuti a temperatura ambiente, i restanti 10 minuti in incubatore a 37°C in aria (*Fabbri et al 2001*). Dopo 3 ore di coltura in HTF, viene valutata la % di sopravvivenza ovocitaria; dopodichè, sono stati allocati in modo random e processati come segue:

1. fissazione e preparazione per la microscopia elettronica;
2. valutazione di danni funzionali a carico dei mitocondri mediante marcatura in vivo con la sonda potenziale sensibile JC1 ;

3. marcatura tramite tecnica Tunel per individuare eventuale frammentazione del DNA;
4. valutazione dei livelli di calcio in risposta allo ionoforo A 23187.

3. Protocollo di vitrificazione

Sono stati vitrificati all'incirca 120 ovociti. Il protocollo di vitrificazione utilizza come crioprotettivi EG (Sigma 324558), DMSO (Sigma D 2438) e saccarosio (Sigma S 1888) e segue il cosiddetto "Masa's cryotop method" (*Vajta and Kuwayama*). Tutte le soluzioni sono preparate in DPBS supplementato col 1,2% di Human Serum Albumin (HSA) (Vitrolife) a temperatura ambiente. Le soluzioni di congelamento utilizzate sono 2:

-soluzione di Equilibratura (ES): EG 7,5% (1.34 M); DMSO 7,5% (1.059 M); 1.2 % HSA in DPBS.

-soluzione di Vitrificazione (VS): EG 15% (2.68 M); DMSO 15% (2.118 M); 1.2 % HSA in DPBS.

Su un coperchio Petri sono state allestite 1 goccia da 20 µl di DPBS (D); 3 gocce da 20 µl di soluzione di equilibratura (ES1, ES2, ES3) ed 1 goccia da 20 µl di soluzione di vitrificazione (VS). Un massimo di due ovociti viene messo nella goccia DPBS per 1 minuto. Successivamente la goccia ES1 è stata fusa alla D per 3 minuti e poi fusa con la ES2 per altri 3 minuti. Mediante utilizzo di una flexipipette cook, gli ovociti sono stati spostati in cima alla goccia ES3 dove vi sono rimasti per circa 9 minuti. Da qui sono stati poi trasferiti nel minimo volume possibile nella

goccia VS per un tempo massimo di 90 secondi, cercando al contempo di eliminare i residui di ES in eccesso visibili allo stereomicroscopio per la diversa densità delle due soluzioni. Gli ovociti sono stati caricati nella cryotip, sigillati ed immersi in maniera verticale in azoto liquido, mediante brevi ondulazioni laterali al fine di ottenere un cooling rate di $23000^{\circ}\text{C}/\text{min}$, entro 1min 30 sec di esposizione alla soluzione di vitrificazione. Nella figura 1 è riportato schematicamente il procedimento di vitrificazione.

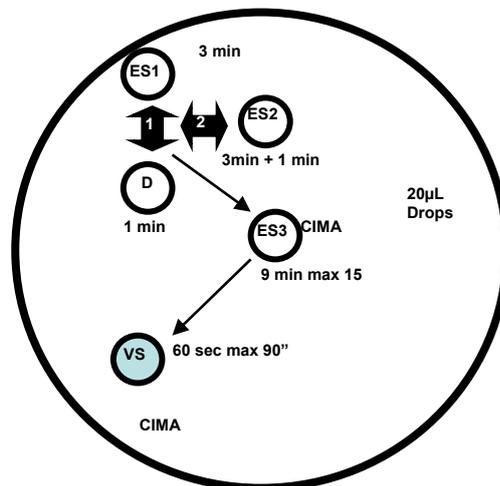


Figura 1: schema di vitrificazione secondo Vajta and Kuwayama (ES: soluzione di equilibratura; VS: soluzione di vitrificazione; D: Dulbecco'sPBS

Le soluzioni di scongelamento sono:

Thawing solution (TS): saccarosio 1M +1.2 % HSA in DPBS

Dilution solution (DS): saccarosio 0.5M +1.2 % HSA in DPBS

Washing solution (WS): 1.2 % HSA in DPBS.

Allo scongelamento le cryotip sono passate dall'azoto liquido (-196°C) al bagnetto termostato a 37°C dove vi sono rimasti per 3 secondi circa. Dopo gli ovociti sono stati scaricati dalla cryotip accanto ad una goccia da 1 ul di TS (ad una temperatura di 37°C). Le due gocce sono state unite per 10 secondi. Poi gli ovociti sono stati trasferiti in una petri contenente 4,5 ml di TS per 1 minuto. In queste condizioni si raggiungono delle thawing rate di 42000°C/min. Dopo un minuto è stato caricato nel capillare cook un po' di TS, poi gli ovociti e poi circa 2 mm di TS. Si veniva a formare quindi sul fondo della piastra contenente 4,5ml di DS una goccia di TS contenente gli ovociti. Dopo 3 minuti è stata caricata nel capillare, allo stesso modo della TS, anche la DS che insieme agli ovociti è stata trasferita sul fondo di una petri contenente 4,5 ml di WS. Dopo 5 minuti gli ovociti sono stati trasferiti in una seconda piastra di washing solution per altri 5 minuti (fig.2). A questo punto gli ovociti sono stati coltivati in mezzo di coltura G-FERT (Vitrolife) per 2 ore prima di determinarne la % di sopravvivenza. Parte degli ovociti è stata fissata e trattata per la microscopia elettronica; parte utilizzata in esperimenti di risposta allo ionoforo A 23187.

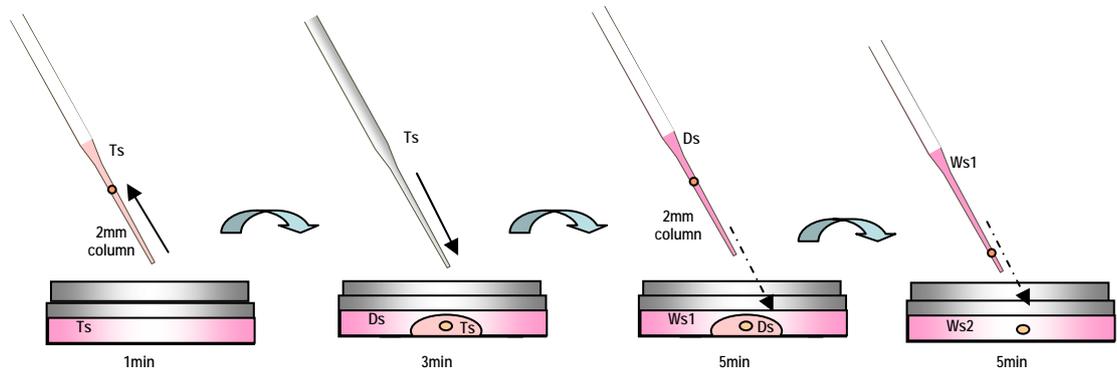


Figura 2: procedura di scongelamento secondo “Masa’s cryotop method” (Vajta)

4. Caricamento con Fluo4-AM

Al fine di monitorare le variazioni dei livelli di calcio intracellulari, in seguito a esposizione a soluzioni di equilibratura/vitrificazione e a ionoforo A 23187, gli ovociti freschi o congelati/scongelati con metodo lento o per vitrificazione sono stati caricati con indicatore Fluo4-AM (Molecular probes). La presenza del gruppo acetometil estere (AM) permette all’indicatore di penetrare attraverso la membrana plasmatica; dopo l’idrolisi del legame esterico ad opera delle esterasi citoplasmatiche l’indicatore resta compartimentalizzato all’interno del citoplasma ovocitario. Gli ovociti sono stati trattati per 30 minuti a 37°C, 5%CO₂, in presenza di fluo 4-AM 10 uM e Pluronic F127 allo 0,02% (Molecular Probes) in DPBS. Per permettere la deesterificazione e la compartimentalizzazione del fluo 4AM, gli ovociti sono stati incubati per altri 30 minuti in solo DPBS. Al

termine ciascun ovocita è stato posto in una goccia di DPBS, ricoperta di olio minerale (Cook) in una Glass Bottom Dish (WillCo-dish) e posto al microscopio invertito Nikon dotato di micromanipolatori per ICSI. Qui con una pipetta da suzione (holding) l'ovocita veniva bloccato e si procedeva alle acquisizioni mediante cinematografia ad intervalli di tempo (time-lapse).

5. Esposizione ovocitaria a soluzioni di equilibratura e vitrificazione.

Quando gli ovociti venivano posizionati nella goccia di DPBS al microscopio invertito e bloccati mediante l'ausilio di una holding da ICSI, veniva fatta partire l'acquisizione in fluorescenza di 2 immagini che ci daranno i valori di base di fluorescenza (F_0) dell'ovocita. A questo punto veniva aggiunta alla goccia con l'ovocita la soluzione di equilibratura (EG 7,5% DMSO 7,5%) o la soluzione di vitrificazione (EG 15% DMSO 15%). Le acquisizioni time lapse sono state effettuate ad intervalli di 10 secondi per 10 minuti in presenza delle soluzioni di equilibratura e per 3 minuti in presenza di quella di vitrificazione. Le intensità di fluorescenza registrate dopo avere aggiunto i crioprotettivi rappresentano la nostra F_1 .

6. Esposizione ovocitaria a ionoforo A23187

Quando gli ovociti venivano posizionati nella goccia di DPBS al microscopio invertito e bloccati mediante l'ausilio di una holding da ICSI, veniva indotta l'acquisizione in fluorescenza di

2 immagini che ci daranno i valori di base di fluorescenza (F_0) dell'ovocita. A questo punto è stato aggiunto alla goccia lo ionoforo A23187 (Sigma C7522) ad una concentrazione finale di $10\mu\text{M}$. Durante l'esposizione è stato utilizzato il tavolino termostato settato alla temperatura di 37°C . Anche in questo caso le sono state effettuate le acquisizioni time lapse ad intervalli di 10 sec per 3 minuti.

7. Determinazione dei livelli di calcio ionico intracellulare.

Gli esperimenti effettuati per determinare i livelli di calcio ionico intracellulare sono stati realizzati in Time Lapse, mediante telecamera Nikon DS-U2 ed il NIS- Element Imaging Software (A:R. 3.0) utilizzando un microscopio invertito Nikon TE-2000. Il suddetto software è stato utilizzato per creare delle "roi", ovvero una regione di interesse di area fissa da poter applicare di volta in volta a tutte le immagini che si sono susseguite nell'arco dell'acquisizione, al fine di poter determinare l'intensità di fluorescenza sempre su una medesima parte dell'ovocita. Le variazioni dei livelli di calcio intracellulari sono state calcolate determinando l'incremento percentuale di intensità di fluorescenza relativa (RFI%). L'RFI% è stata ottenuta sottraendo a tutte le intensità di fluorescenza F_1 dopo aggiunta di crioprotettivo o di ionoforo, le intensità di fluorescenza basali, F_0 , e dividendo il risultato

ottenuto per FO e moltiplicandolo successivamente per 100. La formula utilizzata è stata quindi: $RFI\% = ((F_1 - F_0) / F_0) \times 100$.

8. Effetti del processo di vitrificazione sui livelli di calcio intracellulare in ovociti freschi.

Per monitorare le alterazioni di calcio dovute alle varie soluzioni contenenti crioprotettivi durante il processo di vitrificazione, sono state seguite le oscillazioni di calcio intracellulare di circa 8 ovociti simulando l'intera metodica di congelamento. Pertanto ogni ovocita è stato trasferito dopo caricamento con fluo 4AM in una piastra Glass Bottom Dish (WillCo-dish) in circa 120 microlitri di DPBS, posto al microscopio invertito Nikon dotato di micromanipolatori per ICSI e bloccato mediante suzione da una holding. Dopo l'acquisizione delle prime due immagini, sono state aggiunte, secondo i tempi del protocollo di vitrificazione le varie soluzioni. Precisamente: EG/DMSO 3,75% per 2 min; EG/DMSO 5% per 2 min; EG/DMSO 7,5% per 3 min; EG/DMSO 15% + saccarosio 0,5M per 2 min. Le acquisizioni time lapse sono state fatte ogni 10 sec per circa 9 minuti, tempo indicato nel protocollo di vitrificazione. Dal momento che la letteratura ci suggerisce che escursioni di calcio possono essere date dalla presenza dello ione nei mezzi di congelamento, l'esperimento è stato duplicato anche in presenza di DPBS calcium free.

9. Effetti dei singoli crioprotettivi sui livelli di calcio intracellulare in ovociti freschi.

Una volta testate le oscillazioni dei livelli intracellulari di calcio delle varie soluzioni usate nel protocollo di congelamento lento e vitrificazione, sono stati testati i singoli crioprotettivi al fine di individuare il comportamento di ciascuno. Pertanto un totale di 20 ovociti sono stati utilizzati per questi esperimenti. Ogni ovocita è stato trasferito dopo caricamento con fluo 4AM in una piastra Glass Bottom Dish (WillCo-dish) in circa 120 microlitri di DPBS, posto al microscopio invertito Nikon dotato di micromanipolatori per ICSI e bloccato mediante suzione da una holding. I crioprotettivi sono stati testati alle concentrazioni utilizzate nei rispettivi protocolli e quindi:

-per il congelamento lento: Pr-OH 1,5 M. Acquisizioni time lapse per 10 min ogni 10 sec.

- per la vitrificazione: EG 15%. Acquisizioni time lapse per 10 min ogni 10 sec. DMSO 15% .Acquisizioni time lapse per 10 min ogni 10 sec. Anche in questo case per valutare l'influenza del calcio presente nelle soluzioni di congelamento, gli esperimenti sono stati duplicati utilizzando come mezzo base il DPBS senza calcio.

10. Osservazioni ultrastrutturali mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Ovociti freschi ed ovociti congelati/scongelati sia con congelamento lento che con vitrificazione sono stati processati per la microscopia elettronica a trasmissione al fine di determinarne la struttura e gli eventuali danni arrecati dal congelamento. Le strutture monitorate sono state l'integrità e la disposizione mitocondriale; il numero di granuli corticali; la presenza e la larghezza di vescicole di reticolo endoplasmatico liscio; la redistribuzione degli organelli all'interno del citoplasma. Gli ovociti pertanto sono stati fissati per 1 ora in gluteraldeide 2,5% in sodio cacodilato, pH 7.2 a temperatura ambiente. Prima di avviare la postfissazione in tetrossido di osmio 1% a 4°C per circa 1 ora, gli ovociti sono stati lavati 3 volte in tampone cacodilato+polivinilalcol per 15 minuti. Dopo postfissazione si sono susseguiti ulteriori 3 lavaggi in tampone per 15 minuti cadauno. Sono stati poi effettuati un passaggio in acido tannico 0,1% per 10 minuti e successivi lavaggi in tampone. La disidratazione è stata fatta in serie ascendente di etanolo (Carlo Erba) (1x5 min in Et-OH 35°; 1x5 min in Et-OH x50°; 1x5 min in Et-OH 70°; 2x10 min in Et-OH 90° a 4°C; 2x10 min in Et-OH 100° a t.a). Dopo disidratazione gli ovociti sono stati trasferiti in ossido di propilene per 3 minuti e poi trasferiti in una miscela 1:1 di ossido di propilene /resina epossidica. Si è lasciato infiltrare la resina overnight, poi sono seguiti 2 cambi ogni 3 ore di sola resina epossidica. Ogni ovocita è stato trasferito in una capsula beam ed incluso in

resina fresca e lasciato polimerizzare in stufa a 60°C per 72 ore. Si è proceduto al taglio all'ultramicrotomo di sezioni semifini, circa 1 micron. Una volta certi di essere giunti più o meno all'equatore dell'ovocita, previa marcatura delle sezioni semifini con blu di toulidina, si è passato al taglio delle sezioni ultrafini, 50-70 nm, e alla raccolta delle fette su retini di rame. Una volta asciugati i retini sono stati colorati con doppia marcatura in acetato di uranile per 10 minuti e poi in piombo di Reynolds per 5 minuti. I campioni sono poi stati osservati al TEM presso il CISME sito all'Orto Botanico -Via Foria- Napoli. Una volta ottenute, le immagini sono state analizzate mediante il software NIS element AR 3.0, il quale permette di calcolare i profili di membrana lungo il quale venivano poi quantizzati i granuli corticali. Il numero di granuli corticali ottenuto per ciascun campione sarà espresso per 10 micron di profilo di membrana. Lo stesso software permette di calcolare l'area di ciascuna vescicola di reticolo endoplasmatico liscio, ottenendo alla fine un valore medio per ciascun campione, compresi i valori minimi e massimi con le relative deviazioni standard.

11. Analisi citochimica al microscopio a fluorescenza

In tutti gli esperimenti descritti di seguito, dopo centratura della lampada UV, le immagini venivano acquisite utilizzando lo stesso tempo di esposizione e trattate mediante software (Adobe Photoshop) con le stesse curve di livello per permettere il confronto tra diversi campioni.

12. Marcatura con la miscela di reazione TUNEL

Questa metodica è utilizzata per rivelare cellule che contengono rotture (nick) a singolo e a doppio filamento più o meno estese lungo la molecola di DNA nucleare.

La miscela di reazione TUNEL (ROCHE , Germany : “In situ cell death detection”) è costituita da un enzima , la *TdT* (Terminal deoxynucleotidyl transferase), il quale catalizza la reazione di polimerizzazione di nucleotidi (aggiunti sempre alla miscela) marcati con fluoresceina (*Gold et al., 1994*), all'estremità libere 3'OH delle molecole di DNA frammentate sia a livello di singolo che di doppio filamento.

I nucleotidi marcati “riempiono” le interruzioni a livello di singolo o doppio filamento presenti sul DNA ed emettono una tipica luce verde in fluorescenza, tanto più intensa quanto più sono estese le rotture sul DNA.

Ovociti criopreservati con congelamento lento sopravvissuti o meno al processo di congelamento-scongelo sono stati fissati in paraformaldeide al 4% in PBS per 1 ora a temperatura ambiente e lavati 3 volte per 15min in PBS per eliminare il fissativo residuo. Gli ovociti sono stati poi permeabilizzati con 0.2% Triton X 100 in 0.1% sodio citrato per 30min su ghiaccio.

La permeabilizzazione ha lo scopo di rendere permeabile la membrana plasmatica all'ingresso dei reagenti che si aggiungeranno successivamente.

I campioni sono stati incubati in miscela TUNEL per 1 ora a 37°C. I controlli positivi sono stati effettuati preincubando

alcuni ovociti in Dnasi I 3U/ml in Tris-HCl 50mM, 1mg/ml di BSA per 10min a t.a. prima dell'incubazione in miscela TUNEL.

13. Localizzazione di caspasi attivate: Marcatura con l'inibitore fluorescente delle caspasi FITC-VAD-FMK

Al fine di determinare se ovociti sia sopravvissuti che non sopravvissuti al processo di congelamento lento/scongelo rapido possano essere entrati in apoptosi, gli stessi sono stati marcati in vivo con l'inibitore fluorescente delle caspasi FITC-VAD-FMK (Promega). Gli ovociti sono stati trattati con FITC-VAD-FMK 5uM in mezzo di coltura IVF (Cook) per 1 ora a 37°C, 5% CO₂ in aria. Al termine dell'incubazione si procedeva a 2 lavaggi di 10min in solo mezzo di coltura a 37°C, al montaggio su vetrino in mezzo di coltura e all'osservazione al microscopio a fluorescenza su tavolino riscaldato a 37°C in contrasto di fase e fluorescenza con filtri per fluoresceina.

14. Determinazione della polarità dei mitocondri: Marcatura con sonda potenziale-sensibile JC-1

Il trasporto attivo di protoni attraverso la membrana mitocondriale interna verso la camera mitocondriale esterna provoca due fenomeni, una differenza di potenziale elettrico a livello della membrana mitocondriale interna ($\Delta\psi_m$) ed un gradiente di pH. L'energia immagazzinata in questi due componenti guida la conversione di ADP ad ATP da parte degli enzimi della catena respiratoria. JC1 è un marcatore

fluorescente liposolubile e cationico derivato della carbocianina che si accumula all'interno della matrice mitocondriale e le caratteristiche della sua emissione fluorescente sono correlate ai valori della differenza di potenziale a livello della membrana mitocondriale interna (*Reers et al., 1991,1995*). E' stato dimostrato che la quantità di JC1 che entra nei mitocondri è direttamente correlata al loro potenziale e che il JC1 se accumulato in quantità elevate multimerizza producendo una emissione nel rosso a circa 590nm mentre se invece viene accumulato in basse quantità produce una emissione nel verde a circa 529nm. In particolare, mitocondri con $\Delta\psi_m < -100mV$ hanno fluorescenza verde mentre quelli con $\Delta\psi_m > -140mV$ hanno fluorescenza giallo-rossa (*Reers et al., 1995; Cossarizza et al., 1996*).

Ovociti freschi e criopreservati, venivano trattati con JC-1 (Molecular Probes) alla concentrazione di 2 μ M in mezzo di coltura IVF per 30min. Dopo due lavaggi di 10min in mezzo di coltura, gli ovociti venivano montati su vetrini e venivano acquisite immagini degli stessi campioni alternativamente con filtro per fluoresceina e con filtro per rodamina. Come controllo negativo alcuni ovociti sono stati pre trattati con il disaccoppiante mitocondriale CCCP (carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone) ad una concentrazione di 50 μ M prima dell'addizione di JC-1. Il CCCP è un acido debole liposolubile che entra nei mitocondri nella sua forma protonata scaricando il gradiente di pH e successivamente esce dai mitocondri sotto forma di anione distruggendo il potenziale

presente a livello della membrana mitocondriale interna cortocircuitando la catena respiratoria.

“TESSUTO OVARICO”
MATERIALI E METODI

MATERIALI E METODI

1. Prelievo della corticale ovarica umana e bovina

Dopo aver ottenuto il consenso informato, una porzione di circa 2 cm² di corticale ovarica veniva prelevata durante un'operazione di laparoscopia da sei pazienti con differenti patologie a carico dell'apparato riproduttivo (endometriosi, mioma, utero fibromatoso, cisti ovarica ed ispessimento della corticale ovarica) in età compresa tra i 25 ed i 40 anni. I campioni erano poi direttamente immersi in gamet buffer (COOK) e trasportati in laboratorio entro 1 h in mini-incubatore alla temperatura di 37°C. Per quanto concerne il prelievo della corticale ovarica bovina, le ovaie erano prelevate direttamente dal corpo dell'animale, durante la sua eviscerazione. Erano trasportate in laboratorio entro 2 h, a secco in borsetta termica alla temperatura di 37°C.

2. Preparazione del tessuto ovarico

In laboratorio, con l'ausilio di uno stereomicroscopio, il tessuto ovarico è stato ripulito dalla porzione midollare mediante un bisturi sterile. La corticale veniva tagliata in strip di 8 mm x 4mm x 1mm usando delle forbici da dissezione. Il taglio era realizzato, in condizioni sterili, a temperatura ambiente (22-25°C), in una capsula Petri contenente TCM-199 (SIGMA), addizionato con gentamicina 50 µg/mL (SIGMA), penicillina 100 U/ml (Sigma Aldrich), streptomina 100 µg/ml (Sigma Aldrich), hepes 20 mM (Sigma Aldrich) e FCS 5% (Sigma Aldrich).

Delle strip ottenute, 4 erano fissate in Bouin (formato da 15 parti acido picrico, 5 parti formaldeide, 1 parte acido acetico glaciale) oppure in glutaraldeide 2,5% a 4°C come campioni di controllo, rispettivamente per la microscopia ottica e per la microscopia elettronica. La restante parte veniva lavata in capsula Petri contenente mezzo base costituito da MEM (Sigma Aldrich) addizionato con gentamicina 50 µg/mL, FCS 12%, penicillina 100 U/mL e streptomina 100 µg/mL per 5 minuti e poi equamente divisa per i processi di vitrificazione e congelamento lento.

3. Protocollo Li Yu-Bin: Vitrificazione e scongelamento

Vista la difficoltà di reperire tessuto ovarico, nel caso dell'umano, soltanto poche strip (3-4) erano deidratate usando un sistema a due step dove il mezzo base è costituito da MEM (Sigma Aldrich) addizionato con gentamicina 50 µg/mL, FCS 12%, penicillina 100 U/mL e streptomina 100 µg/mL. Le strip venivano immerse per 5 min in una soluzione di mezzo base, addizionato con 2M DMSO (Sigma Aldrich) e 0,1 M saccarosio (sigma Aldrich) e successivamente venivano trasferite per ulteriori 5 min in una soluzione di mezzo base addizionato con 2M DMSO (Sigma Aldrich), 2 M Pr-OH e 0,2 M saccarosio (sigma Aldrich)

A tal punto, ogni singola strip, con il supporto di una pinzetta, era rilasciata in un contenitore poco profondo contenente azoto liquido fino al congelamento. Le strip erano quindi raccolte e riposte in Cryotubes NUNC precedentemente riempiti di azoto

liquido. I Cryotubes venivano stoccati in azoto liquido alla temperatura di -196°C , a tempo indefinito.

Al momento dello scongelamento, il tessuto vitrificato era prelevato dai cryotubes con l'ausilio di pinzette e rilasciato rapidamente in un piccolo contenitore ricolmo di azoto liquido. Successivamente le strips di tessuto venivano trasferite in una capsula Petri, contenente PBS secondo Dulbecco (0,90 mM CaCl_2 , 2,67 mM KCl , 1,47 mM KH_2PO_4 , 0,50 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 138 mM NaCl , 8,10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), preriscaldata alla temperatura di 38°C , per qualche minuto (max 2 min) fino al totale scongelamento. A questo punto, i campioni erano reidratati mediante esposizione, a temperatura ambiente, a soluzioni contenenti concentrazioni decrescenti di saccarosio (0,5M; 0,25M; 0,125M), sia per evitare la crescita di piccoli cristalli di ghiaccio eventualmente presenti nel tessuto che per minimizzare stress osmotici. In ultimo, le strip erano lavate tre volte in mezzo base ed incubate nello stesso mezzo ad una temperatura di 37°C per 1 h.

I campioni erano a tal punto processati in parte per la microscopia ottica ed in parte per la microscopia elettronica.

4. Protocollo Li Yu-Bin con colina: Vitrificazione e scongelamento

Strips di tessuto erano sottoposte alla medesima procedura di vitrificazione e scongelamento secondo protocollo Li Yu-Bin, utilizzando però come mezzo base D-PBS in cui il Cloruro di Sodio era sostituito con Cloruro di Colina alla medesima

concentrazione, addizionato con FCS 12%, penicillina 100 U/ml e streptomina 100 µg/mL.

5. Protocollo Li Yu-Bin: Congelamento lento e scongelamento rapido

Anche in questo caso venivano utilizzate circa 3-4 strip le quali erano trasferite per 5' in una capsula Petri contenente mezzo base + 1.5 M DMSO, a temperatura ambiente. Le strip erano poi distribuite in cryotubes precedentemente riempiti con 1 mL di mezzo base + 1.5 M DMSO + 0.1 M saccarosio e sottoposte ad un ciclo di congelamento in un cryofreezer programmabile. La curva di congelamento prevedeva: raffreddamento da 4°C a -8°C ad una velocità di -2°C/min; 10min a -8°C; seeding manuale con pinze precedentemente raffreddate in azoto liquido; raffreddamento da -8°C a -40°C ad una velocità di -0.3°C/min; raffreddamento da -40°C a -150°C ad una velocità di -50°C/min; immersione in azoto liquido. I cryotubes erano trasferiti e conservati a -196°C, fino al momento dello scongelamento. In tal caso, i cryotubes erano scongelati a temperatura ambiente per 1min e poi immersi in un bagnetto termostato ad una T di 38°C per 2 min. Da questo momento in poi si procedeva alla deidratazione dei campioni, al lavaggio e all' incubazione a 37°C per 1 h come da protocollo di scongelamento per la vitrificazione. Anche in tal caso, i campioni erano processati in parte per la microscopia ottica ed in parte per la microscopia elettronica.

6. Protocollo con colina: Congelamento lento e scongelamento

Analogamente a quanto effettuato per la vitrificazione, anche nel caso del congelamento lento, 3-4 strip erano crioconservate e scongelate secondo il protocollo Li Yu-Bin, apportando come sola modifica la sostituzione del mezzo base con D-PBS con colina + 12% FCS + penicillina 100 U/ml e streptomicina 100 µg/mL.

7. Preparazione dei campioni per la microscopia ottica

Le strip di tessuto ovarico erano trasferite per 24 h, a temperatura ambiente, in provette da 15 mL contenenti 5 mL di Bouin, secondo un rapporto tessuto/fissativo 1:10. La fissazione ha lo scopo di bloccare le attività vitali della cellula, rendendo insolubili i componenti strutturali, in modo da stabilizzare le proteine ed inattivare gli enzimi idrolitici. Successivamente i campioni venivano lavati abbondantemente in acqua di fonte e successivamente lasciati nella stessa per 24 h. Il giorno seguente si procedeva alla disidratazione mediante passaggi sequenziali in serie ascendente di etanolo (3x10' Et-OH 75%; 24h Et-OH 75%; Et-OH 95%; 3x10' Et-OH 100%;) prima di procedere all'inclusione in paraffina i campioni venivano chiarificati in Histolemon (Carlo Erba) e successivamente trasferiti in una miscela di quest'ultimo e paraffina 1:1 in stufa a 46°C. successivamente i campioni venivano trasferiti in sola paraffina in supporti metallici e tenuti a 60°C per 24h. In

ultimo, i campioni erano riposti in appositi stampi pieni di paraffina liquida e fatti solidificare per 24 h all'aria.

Il blocchetto di paraffina con il campione era dunque tagliato al microtomo in sezioni dello spessore di 5 μm . Le sezioni così ottenute erano raccolte in maniera seriale su vetrini coperti da una soluzione di albumina glicerinata, usata come collante.

I campioni, così allestiti, erano selezionati per la colorazione. I vetrini scelti erano sparaffinati e reidratati (5' xilolo I, 5' xilolo II, 2' etanolo 100%, 1' etanolo 95%, 1' etanolo 75%, 1' etanolo 50%, sciacquo in H₂O distillata) per consentire il trattamento con i coloranti, soluzioni a base acquosa. I vetrini erano dunque immersi per 5' in una vaschetta contenente Emallume di Mayer, un colorante basico che si lega al DNA e poi lavati in H₂O di fonte corrente per 1-2', per consentire il viraggio del colorante da rosso bordeaux a blu (fenomeno noto come azzurramento) e dare quindi stabilità ai legami. Successivamente, i vetrini erano trattati per 7" con una soluzione acquosa di Eosina G allo 0,5%, precedentemente acidificata con acido acetico glaciale 1/1000, al fine di rendere la colorazione più intensa. Il colorante era poi differenziato mediante passaggi rapidi e sequenziali in etanolo 75% e 95%. Il differenziamento era arrestato in ETOH 100%. I campioni erano, a tal punto, disidratati e chiarificati (2' etanolo 100% I, 2' etanolo 100% II, 2' Xilolo I, sciacquo in Xilolo II) ed in ultimo montati con un vetrino coprioggetto, con interposta una goccia di Hystovitrex (Carlo Erba), una resina sintetica con lo stesso indice di rifrazione del vetro.

Le sezioni così colorate erano osservate e fotografate al microscopio ottico.

8. Analisi statistica

Per ogni tipologia di campione colorato, erano presi in analisi 10 sezioni appartenenti a vetrini differenti. I follicoli erano morfologicamente analizzati e contati. La valutazione della qualità follicolare era basata sulla distribuzione delle cellule della granulosa che circondano l'oocita, sulla presenza o assenza di corpi picnotici, integrità dell'oocita ed eosinofilia dell'ooplasma. In particolare, i follicoli erano stati classificati in tre gruppi, rispettivamente di grado 1, 2 e 3. I follicoli di grado 1 sono di forma sferica, presentano cellule della granulosa distribuite uniformemente, citoplasma omogeneo e nucleo leggermente granulare, con cromatina condensata a formare una struttura densa e tondeggiate. I follicoli di grado 2 presentano le stesse caratteristiche suddette, tuttavia le cellule della granulosa non rivestono regolarmente l'oocita, possono avere una forma irregolare e la cromatina condensata non è facilmente identificabile. I follicoli di grado 3 sono caratterizzati dalla presenza di cellule della granulosa parzialmente o totalmente danneggiate, con citoplasma e nuclei picnotici. I follicoli di grado 1 e 2 sono considerati normomorfi, quelli di grado 3 sono invece classificati come degenerati.

9. Preparazione dei campioni per la microscopia elettronica a trasmissione

I frammenti di cortex ovarica delle dimensioni di circa 1 mm³ erano fissati, per 1,5 h a Temperatura ambiente, in

Glutaraldeide al 2.5% in tampone Cacodilato di Sodio 0,1 M a pH 7,2. Per bloccare la reazione e rimuovere l'eccesso di fissativo erano effettuati 3 lavaggi, da 10min ciascuno, a 4°C, con la soluzione tampone.

I frammenti erano, quindi, post-fissati in Tetrossido di Osmio 1% in tampone, per 1,5 h a 4°C ed infine sottoposti a tre lavaggi, da 15' cadauno a 4°C in tampone. Il tetrossido d'osmio è un agente ossidante lipofilo, che reagisce con i doppi legami dei lipidi riducendosi a biossido di osmio (OsO_2), il quale essendo carico negativamente è attratto da forze elettrostatiche verso il polo idrofilo dei fosfolipidi. La reazione con catene lipidiche limitrofe può determinare ponti intermolecolari, preservando la struttura delle membrane.

I frammenti erano sottoposti ad un lavaggio di 3' a temperatura ambiente in acido tannico 0,15% in soluzione tampone. Seguito da un lavaggio da 5' a temperatura ambiente in tampone.

A questo punto, i campioni erano disidratati, su ghiaccio, in ETOH a concentrazioni crescenti, in particolare (1x5 min ETOH 50%, 2x 10min ETOH 75%, 2 x 15min ETOH 95%; 3x 20min ETOH 100% a T ambiente). I frammenti erano, a questo punto, lavati due volte in ossido di propilene per 5min a t.a.

I campioni erano, dunque, trasferiti a T ambiente in una serie sequenziale di miscele di ossido di propilene/resina epossidica a concentrazioni crescenti di resina: 3 h in miscela con rapporto 2:1, over night in miscela con rapporto 1:1 e 2 cambi in resina pura da circa 2-3 h ciascuno. In ultimo, i frammenti erano riposti in apposite formelle e fatti polimerizzare per 72 h in stufa a 60°C.

I blocchetti di resina così costituiti erano tagliati all'ultramicrotomo in sezioni dello spessore di 1 μm . Le sezioni ottenute erano colorate con blu di toluidina e osservate al microscopio ottico, per identificare piani di sezione contenenti i follicoli di interesse. Si procedeva, quindi, al taglio di sezioni di 50-60 nm di spessore ed alla raccolta su retini di rame.

I campioni, allestiti come da protocollo precedentemente descritto, erano colorati con sali di metalli pesanti per aumentare il contrasto delle diverse strutture cellulari.

I retini erano, dunque, posti per 9 min in gocce di acetato di uranile, lavati con acqua bidistillata, fatti galleggiare su gocce di piombo citrato secondo Reynolds per 11 min infine lavati nuovamente con acqua bidistillata.

Le sezioni così contrastate erano osservate e fotografate al microscopio elettronico a trasmissione.

10. Isolamento dei follicoli

Per l'isolamento dei follicoli, il tessuto ovarico veniva ridotto in frammenti di 0,5mm x 0,5mm x 0,5mm. Il volume di tessuto processato era pari a 320 μL . I frammenti erano poi trasferiti in una conica da 50 ml contenente 10 ml di dPBS, supplementato con Collagenasi di tipo IA (Sigma) 1mg/ml e DNasi I 0,25mg/ml (Roche). La collagenasi svolge il ruolo principale nella digestione del tessuto, andando ad agire sulla matrice extracellulare; la DNasi, invece, degrada il DNA liberato durante la reazione, per evitare la formazione di una massa gelatinosa all'interno della quale resterebbero imbrigliati i

follicoli. Erano effettuate prove differenziali al fine di identificare le concentrazioni più adatte di Collagenasi e DNasi. Il tubo così allestito era posto in un bagnetto termostato a 38°C in agitazione per 30 minuti, durante i quali si favorisce la digestione meccanica, andando a spipettare con una pipetta Gilson, ogni 10min. Prima di procedere al blocco della reazione enzimatica, si prelevavano circa 200µl della soluzione che venivano screenati al microscopio invertito, per assicurarsi della presenza di follicoli. Si procedeva quindi al blocco della digestione enzimatica secondo tre diverse modalità:

1. BLOCCO TERMICO: 5 minuti in ghiaccio e successiva aggiunta di un uguale volume di dPBS a 4°C supplementato con FCS 20%, per 5 minuti.
2. BLOCCO MECCANICO: centrifuga a 800rpm per 5'.
3. BLOCCO IN FBS: aggiunta di un uguale volume di FBS 100%.

La soluzione era raccolta in capsule petri da 6 cm e screenato al microscopio invertito. I follicoli erano recuperati tramite flexi-pet (COOK) con capillari da 130µm o mediante l'ausilio di un micromanipolatore. L'operazione era effettuata nel minor tempo possibile, per evitare la degenerazione dei follicoli. Questi ultimi erano quindi lavati in gocce da 300 µl di mezzo tamponato con Hepes 25mM, supplementato con gentamicina 50µg/mL. Successivamente, alcuni follicoli erano trasferiti direttamente in mezzo di coltura M199 con FCS 20%, 0.47mM acido piruvico, 1% Insulin-transferrin-selenium (GIBCO) per verificare la vitalità mediante piastratura, mentre altri erano vitrificati.

11. Saggi di vitalità

Al fine di valutare la vitalità dei follicoli isolati era effettuata una colorazione con Ioduro di propidio ed l'Hoechst 33342 (sigma). Lo Ioduro di propidio è un colorante di natura fenantridinica, che riesce a penetrare esclusivamente le membrane destabilizzate; in particolare, è un intercalante delle basi azotate, che forma un complesso sufficientemente stabile che emette una fluorescenza rossa quando eccitato. Pertanto le cellule che appariranno rosse al microscopio a fluorescenza verranno considerate morte. L'Hoechst è un colorante penetrante che colora di blu con intensità differente sia cellule vive che morte.

I follicoli venivano trasferiti in mezzo di coltura contenente Ioduro di propidio 50 µg/mL per 30 minuti a 37°C. Al termine, veniva aggiunto Hoechst 33342 10 µg/mL per 5' in incubatore. I follicoli erano quindi lavati per tre volte in mezzo di coltura ed in seguito trasferiti su vetrini coprioggetto 24x60 mm, coperte con vetrini 24x24 mm provvisti di piedini di plastilina per non schiacciarli troppo. I campioni erano, così, pronti per essere osservati al microscopio a fluorescenza, con un ingrandimento 40x.

12. Vittrificazione e scongelamento dei follicoli isolati

La metodica di vittrificazione, mai effettuata su follicoli isolati, risulta particolarmente complessa dal punto di vista tecnico a causa delle ridotte dimensioni dei follicoli e dei tempi brevi nei quali deve avvenire il processo.

I follicoli appena isolati venivano vittrificati in cryotip (Fig. 1).

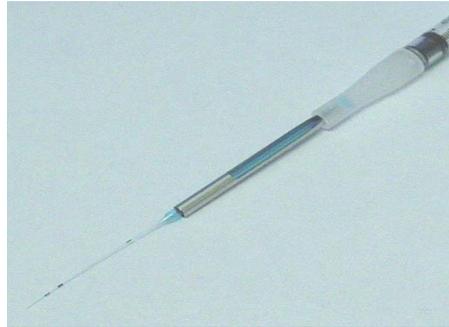


Figura 1: Cryotip.

Le soluzioni adottate per la metodica si basano sul protocollo utilizzato da Kuwayama per gli ovociti (*Kuwayama et al. 2005*). Tutte le soluzioni sono preparate in DPBS supplementato col 1,2% di Human Albumin Serum (Vitrolife) a temperatura ambiente. Le soluzioni di congelamento utilizzate sono 2:

-soluzione di Equilibrazione (ES): EG 7,5% (1.34 M); DMSO 7,5% (1.059 M); 1.2 % HSA in DPBS.

-soluzione di Vittrificazione (VS): EG 15% (2.68 M); DMSO 15% (2.118 M); 1.2 % HSA in DPBS.

Su un coperchio Petri sono state allestite 1 goccia da 20 μ l di DPBS (D); 3 gocce da 20 μ l di soluzione di equilibratura (ES1, ES2, ES3) ed 1 goccia da 20 μ l di soluzione di vittrificazione (VS). La procedura seguiva quella poc'anzi descritta per gli ovociti. Il processo di scongelamento, prevedeva l'utilizzo di una Thawing Solution (TS), Dilution Solution (DS) e di una

TESSUTO OVARICO: materiali e metodi

Washing Solution (WS) rispettivamente costituite da: Saccarosio 1 M, dPBS 1 X, Albumina 1,2%; Saccarosio 0,5M, dPBS 1 X, Albumina 20% e; dPBS 1 X, Albumina 1,2% e segue il protocollo di scongelamento visto per gli ovociti, fatta eccezione per i volumi, infatti in questo caso le gocce delle varie soluzioni erano di 20 μ l. I follicoli una volta isolati, venivano incubati a 37°C nel mezzo di coltura e il loro accrescimento e vitalità monitorate nel tempo.

“OVOCITI”
RISULTATI

RISULTATI

Sopravvivenza ovocitaria

La percentuale di sopravvivenza ovocitaria è stata calcolata valutando allo stereomicroscopio (Leica) e al microscopio invertito (Nikon TE 2000) mediante ottica a modulazione di contrasto, al termine della coltura in vitro post-scongellamento. I parametri presi in considerazione sono stati: integrità di membrana; assenza di citolisi; morfologia della zona pellucida e spessore dello spazio perivitellino.

Su 107 ovociti che sono stati congelati/scongelati con congelamento lento 0.3 M saccarosio, allo scongelamento ne sopravvivevano 81, ovvero circa il 75%. Per quanto concerne il protocollo di vitrificazione, su 120 ovociti vitrificati scongelati, circa 98 sopravvivevano, ovvero l'82%.

Analisi ultrastrutturale di ovociti criopreservati con protocollo di congelamento lento

I dati ultrastrutturali raccolti fino ad ora su 25 ovociti congelati scongelati con protocollo Fabbri, hanno dimostrato che protocolli di congelamento lento a base di 1,2propandiolo 1.5 M e saccarosio 0.3 M inducono una prematura esocitosi dei granuli corticali (GC), uno slargamento delle vescicole di reticolo endoplasmatico (SER), ed una degenerazione mitocondriale (*Gualtieri et al.2008*).

I granuli corticali che nell'ovocita fresco si presentano nel cortex disposti in duplice triplice fila (fig. 1a, b,c) con una densità media di 10.30 ± 3.9 GC per $10 \mu\text{m}$ di profilo lineare analizzato, nell'ovocita slow-freezing sono di gran lunga ridotti con una densità media di 3.35 ± 1.94 granuli per $10 \mu\text{m}$ (fig 2 a,b,c). Una discrepanza è stata ritrovata anche nella dimensione delle vescicole di reticolo endoplasmatico liscio (SER). Infatti le SER nell'ovocita fresco sono per lo più piccole e distribuite in maniera più o meno omogenea in tutto l'ooplasma (Fig1b,c); nell'ovocita criopreservato invece le SER si presentano slargate e addossate ai mitocondri (3a,b). Si è calcolato che il volume medio delle vescicole nell'ovocita fresco è di $0.040 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$, mentre in quello slow-freezing è di $0,084 \pm 0.03 \mu\text{m}^2$ (*Gualtieri et al.2008*).

In accordo a quanto già riportato in letteratura i mitocondri nell'ovocita fresco hanno forma sferica/ovoidale, presentano poche creste, ed una matrice altamente elettrondensa. Dai nostri esperimenti è emerso che il 71% degli ovociti scongelati presenta alterazioni nella struttura e nella matrice mitocondriale (tabella 1) e per lo più a questi danni mitocondriali è collegato uno slargamento delle SER (fig.3a,b).

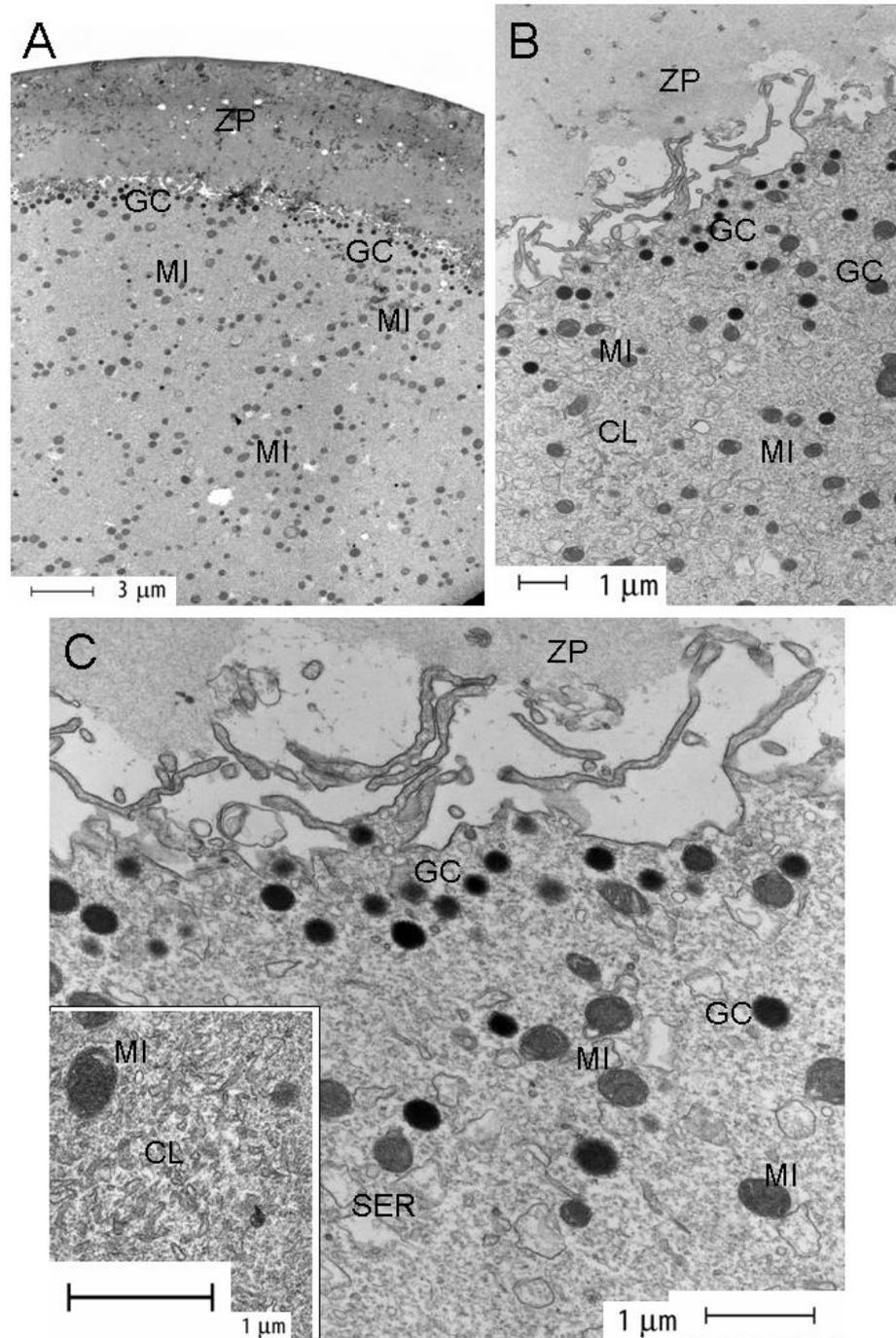


FIGURA 1: Immagine al TEM di ovocita umano fresco. GC=Granuli corticali; MI= mitocondri; SER= reticolo endoplasmatico liscio; CL=cluster (cisterne tubulari di reticolo).

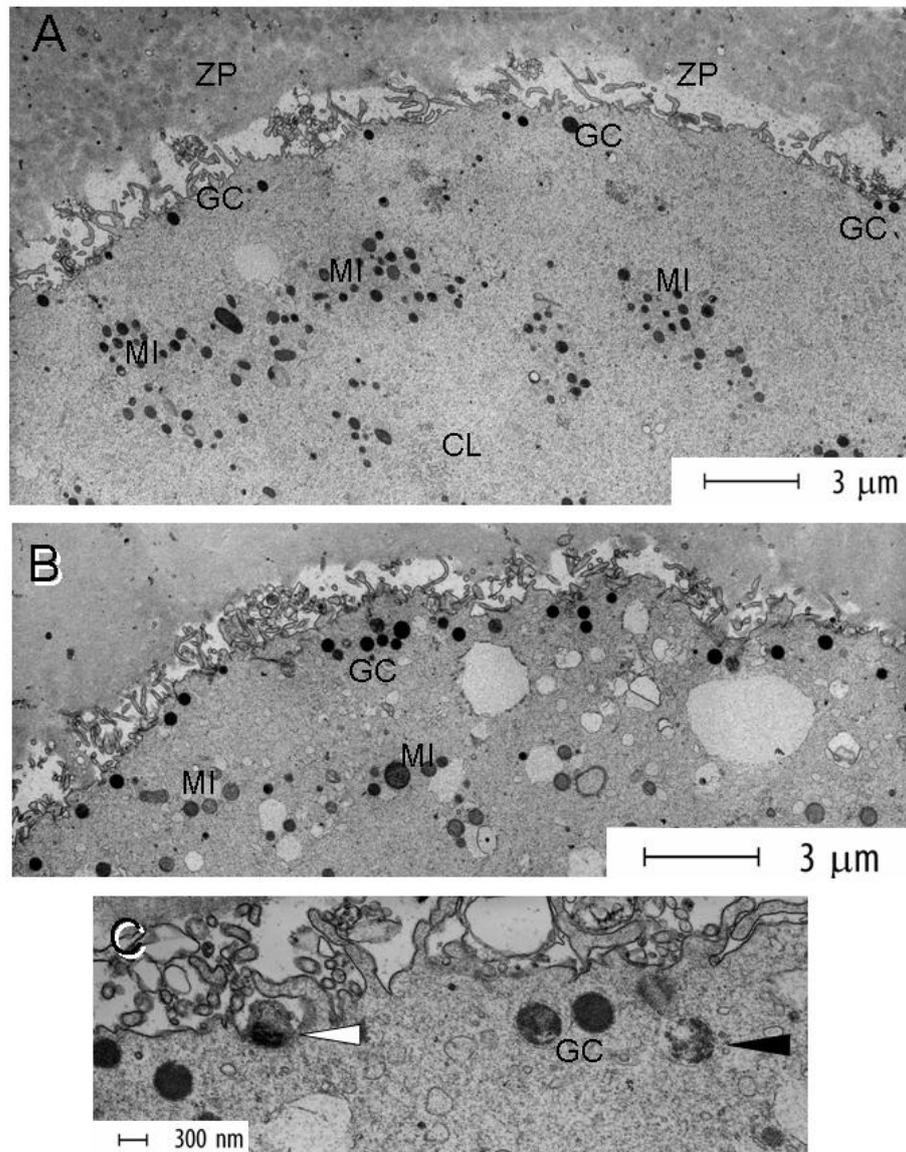


FIGURA2: Immagine al TEM di ovocita umano criopreservato con protocollo congelamento lento/scongelo rapido. GC= Granuli corticali; MI= mitocondri; SER= reticolo endoplasmatico liscio; triangolo nero GC decondensato; triangolo bianco: GC in esocitosi (2C).

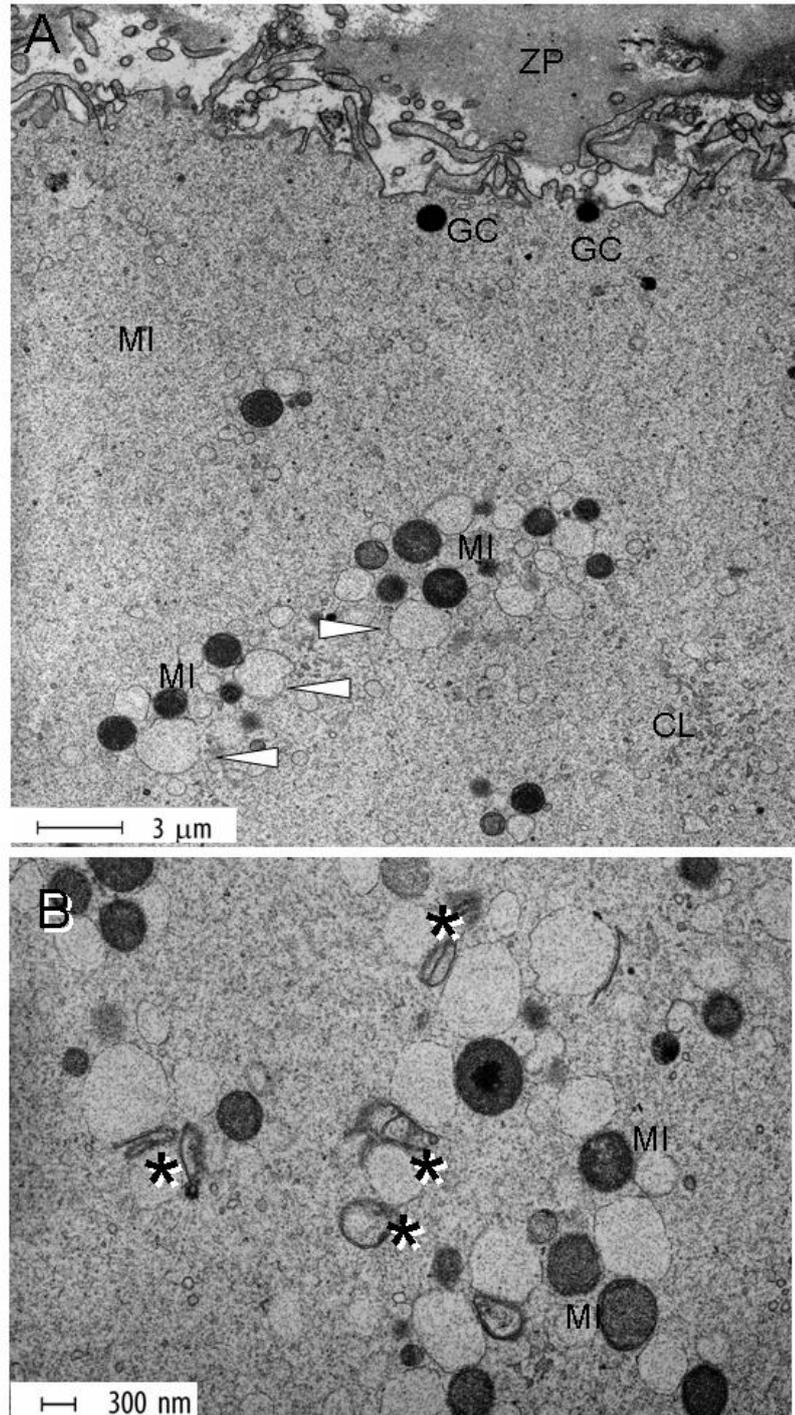


FIGURA 3:Immagine al TEM di ovocita umano criopreservato con protocollo di congelamento lento/scongelo rapido. A) triangolo bianco= SER slargate circondate da Mitochondri B) asterischi= MI in degenerazione

Analisi mitocondriale negli ovociti congelati con protocollo lento

I danni ai mitocondri sono stati monitorati anche in vivo. Mediante l'utilizzo di una sonda potenziale sensibile (JC-1), si è visto che solo il 25% degli ovociti congelati-scongellati (F/T) ha un potenziale di membrana ottimale (>-140 mV), mentre nei campioni freschi la percentuale sale al 77%. Infatti come si nota dalle immagini qui di seguito riportate, gli ovociti freschi marcati con JC-1 presentano una fluorescenza particolata rossa a livello subcorticale, testimonianza del potenziale mitocondriale fisiologico (fig 4d,e,f), mentre gli ovociti criopreservati hanno la fluorescenza rossa solo a livello del globulo polare (fig.5e,f) inoltre sempre negli F/T è evidente una fluorescenza verde, indice di un potenziale al di sotto dei valori ottimali(fig 5b,e).

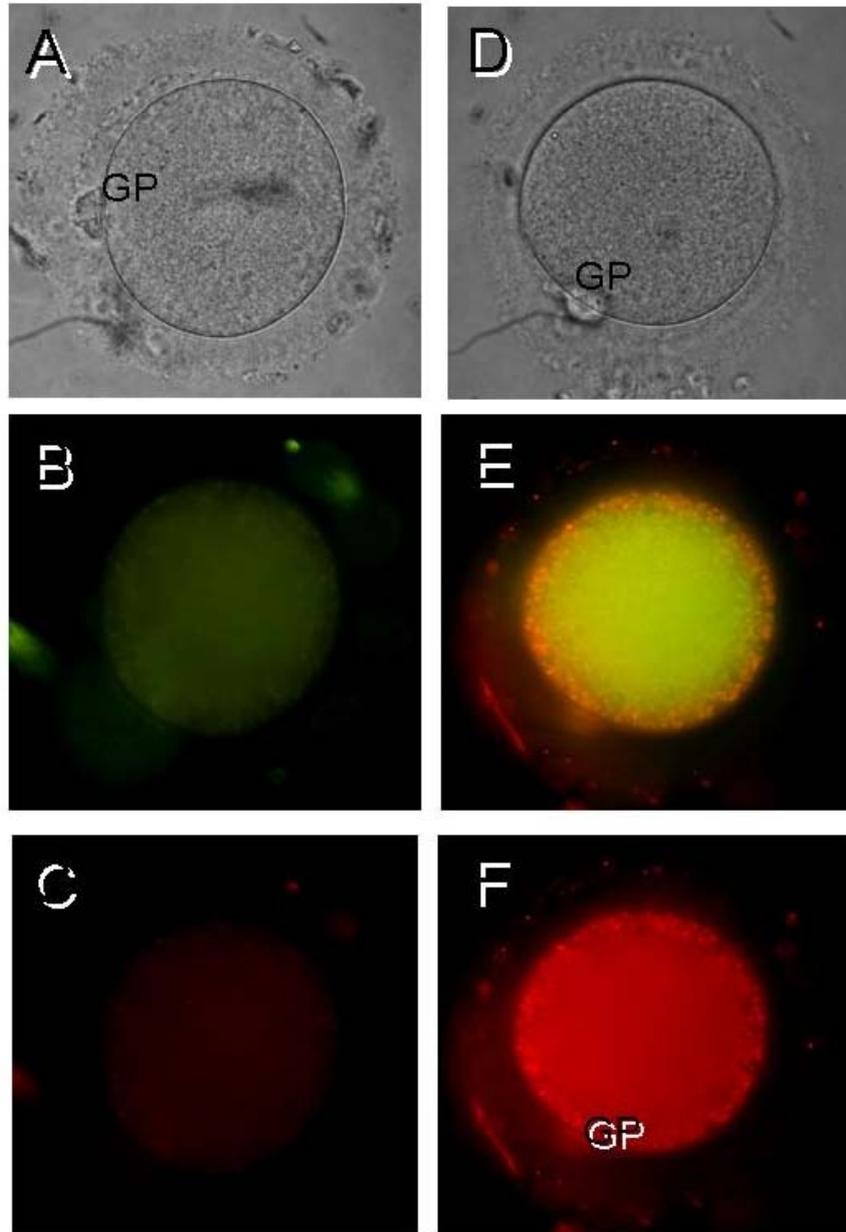


FIGURA 4: Incubazione con JC-1 di: oocita *fresco* controllo, trattato con disaccoppiante, in contrasto di fase(A), filtro per fluoresceina(B) e rodamina(C). Oocita *fresco* trattato in contrasto di fase(D), filtro per fluoresceina (E) e rodamina(F).

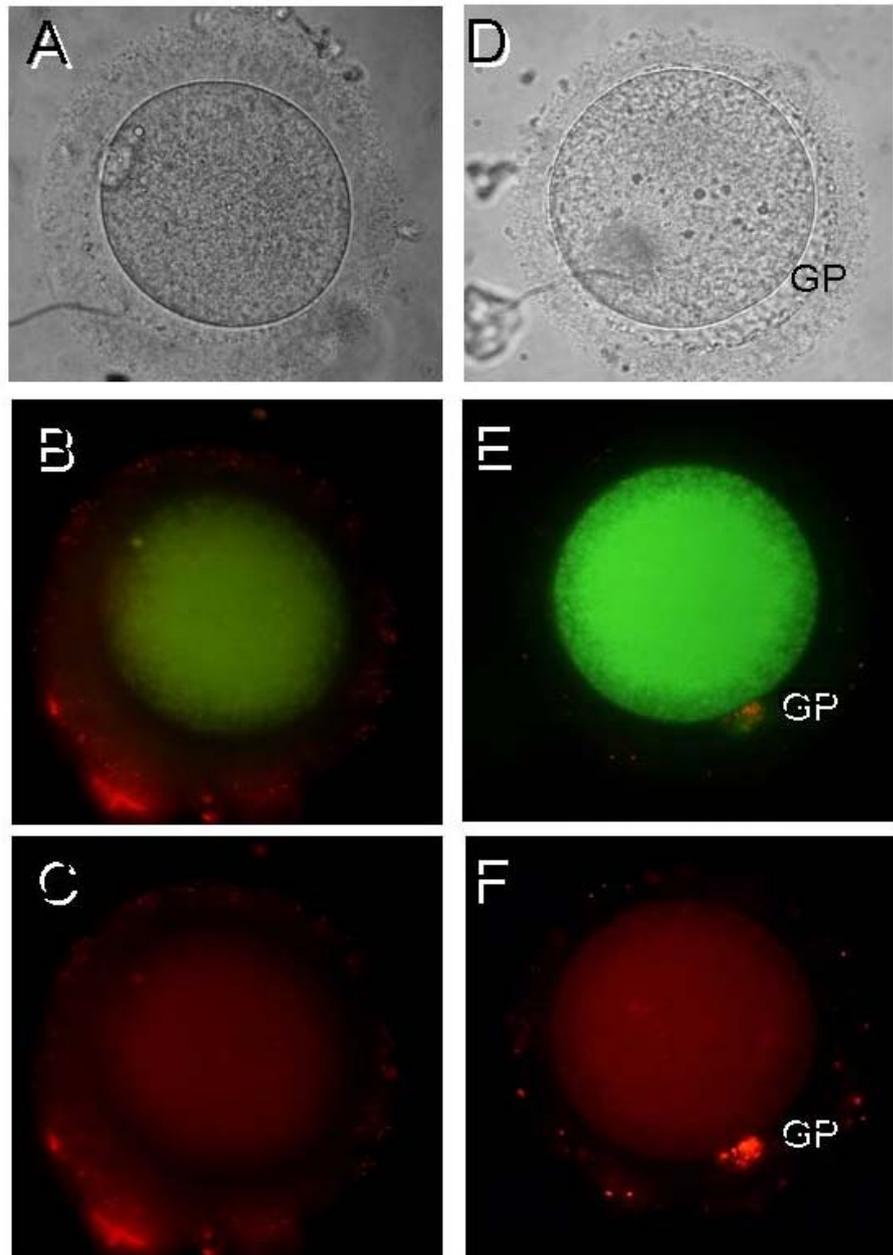


FIGURA 5: ovociti *criopreservati* trattati osservati in contrasto di fase (A,D), con filtro per fluoresceina (B,E) e rodamina (C,F). *Fluorescenza rossa:* Alto $\Delta\psi_m$ mitocondriale a livello delle cellule del cumulo (B,C) e del globulo polare (E,F); *fluorescenza verde:* basso $\Delta\psi_m$ mitocondriale a livello dell'ocita (F).

Frammentazione del DNA in ovociti congelati con protocollo lento

Una causa della bassa competenza degli ovociti criopreservati potrebbe essere costituita da danni al DNA indotti dal congelamento stesso. Nella presente tesi, 15 ovociti criopreservati con protocollo di congelamento lento/scongelo rapido, sono stati analizzati per la presenza di frammentazione del DNA mediante la tecnica TUNEL e controcolorazione del materiale cromosomico mediante Hoechst. Tre ovociti sono stati previamente trattati con DNasi I come controllo positivo. Come si vede in figura 6 (A,B) gli ovociti criopreservati non hanno mostrato alcuna frammentazione del DNA. I segnali fluorescenti presenti in A sono infatti dovuti a fluorescenza endogena a livello di corpi lipidici e non corrispondono al materiale cromosomico evidenziato in Fig6B. La Fig 6 (C,D) mostra la frammentazione del DNA (fluorescenza verde) in un controllo positivo trattato con DNasi I e la corrispondenza con la marcatura del DNA mediante Hoechst (Fig 6E: fluorescenza blu). Una frammentazione del DNA è stata rilevata in alcuni ovociti unicamente a livello di alcune delle cellule del cumulo residuo (Fig 7 A,C), frammentazione non correlabile al processo di criopreservazione in quanto riportata anche in ovociti freschi.

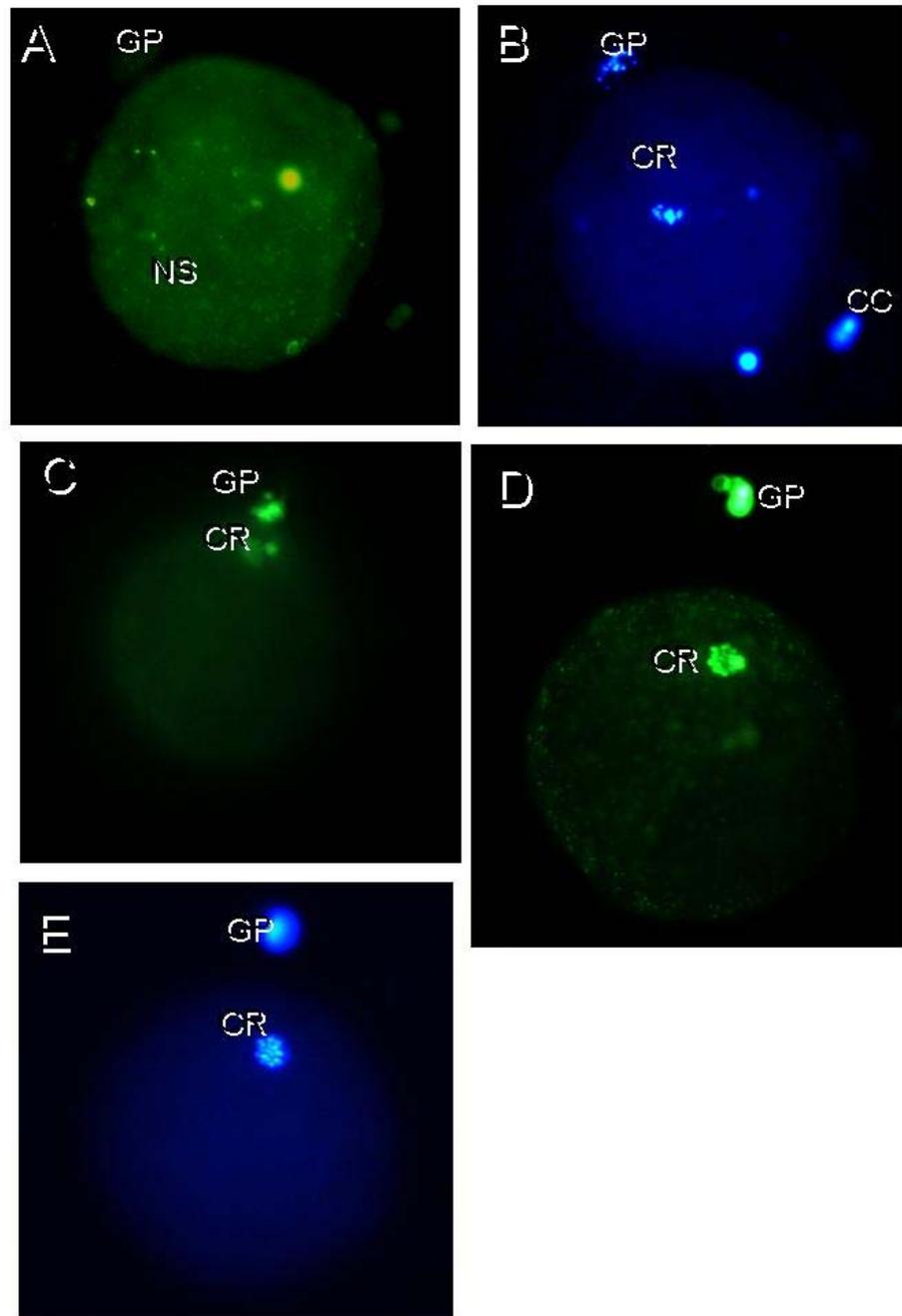


FIGURA 6: (A) ovocita umano criopreservato non sopravvissuto analizzato con tecnica TUNEL e (B) controcolorazione con Hoechst. (C) ovocita sopravvissuto trattato con DNasi I, analizzato con tecnica TUNEL (pre(C) e post (D) schiacciamento) e contro colorazione con Hoechst (E).

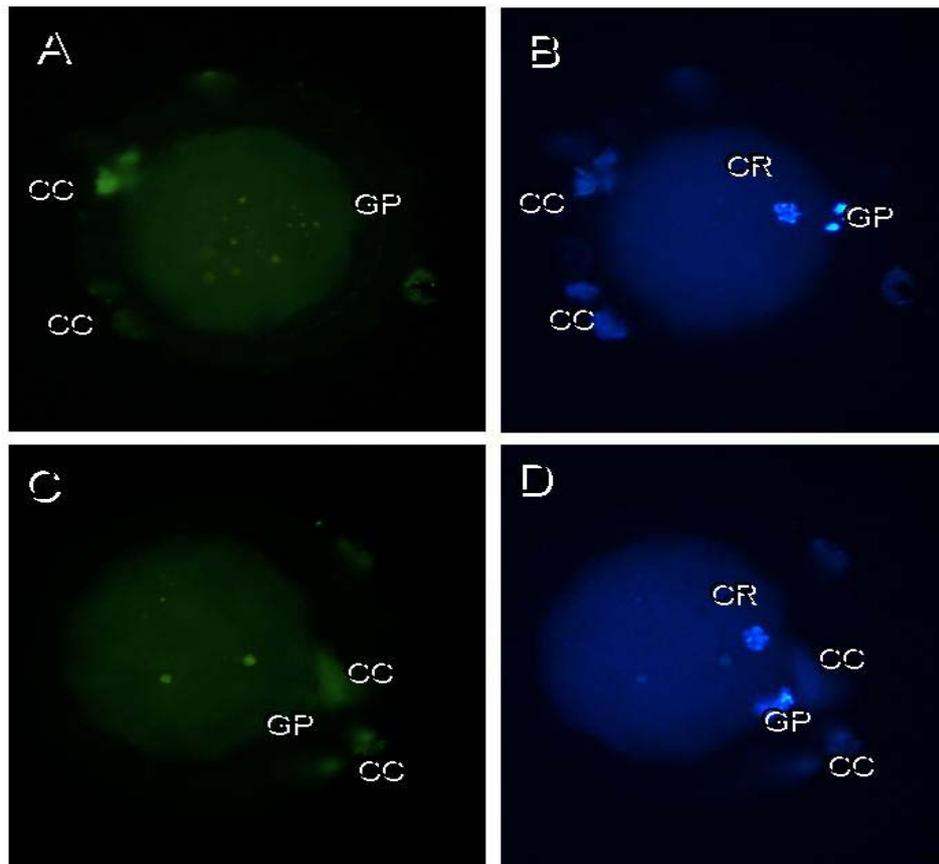


FIGURA 7:ovociti umani criopreservati analizzati mediante tecnica TUNEL (A,C) e controcolorati con Hoechst (B,D). GP= globulo polare. CR= cromosomi. CC= cellule del cumulo.

Caspasi attivate

Allo scopo di determinare se il processo di criopreservazione possa indurre apoptosi, 20 ovociti criopreservati sono stati trattati con l'inibitore fluorescente delle caspasi FITC-VAD-FMK. I risultati (dati non mostrati) non hanno mostrato un incremento della marcatura rispetto a quella presente in ovociti freschi di controllo.

Analisi ultrastrutturale in ovociti vitrificati

Dall'analisi strutturale condotta su 21 ovociti processati con protocollo di vitrificazione, è stato possibile constatare che gran parte degli ovociti scongelati presenta buona morfologia senza mostrare evidenti segni di degenerazione citoplasmatica tanto da essere paragonabile a quanto osservato negli ovociti freschi. La maggior parte dei mitocondri, sia tondi che allungati, risultano avere buona morfologia: essi si presentano con poche creste e con una matrice elettrondensa come tipico dei campioni freschi. E' stato tuttavia evidenziato che solo il 15% degli ovociti analizzati presenta mitocondri danneggiati con evidenti rotture nella doppia membrana e/o con doppia elettrondensità (8 A,B).

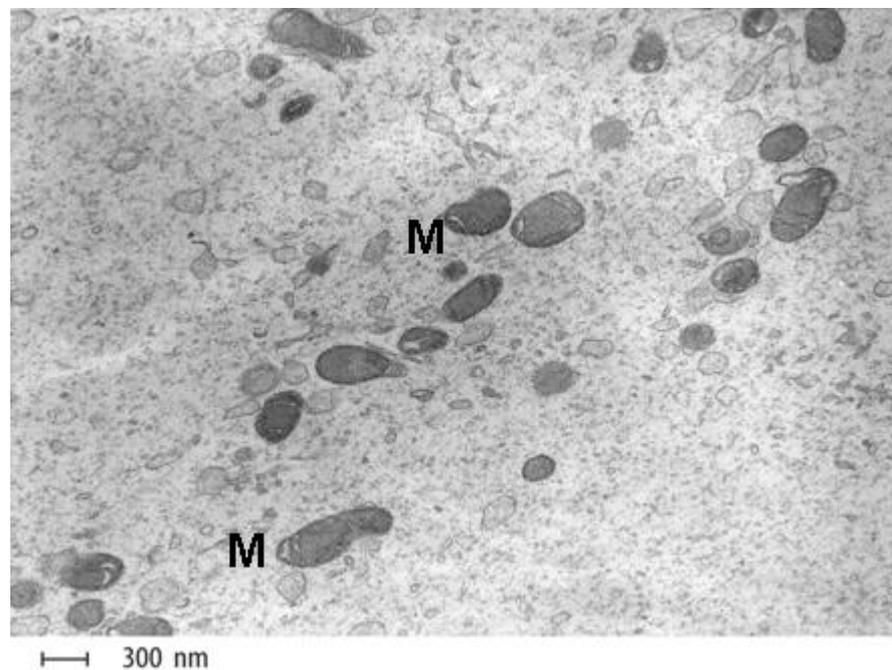


FIGURA 8 A: Immagine al TEM di ovocita umano vitrificato. I mitocondri si presentano con buona morfologia, con poche creste e matrice elettrondensa. M= mitocondri

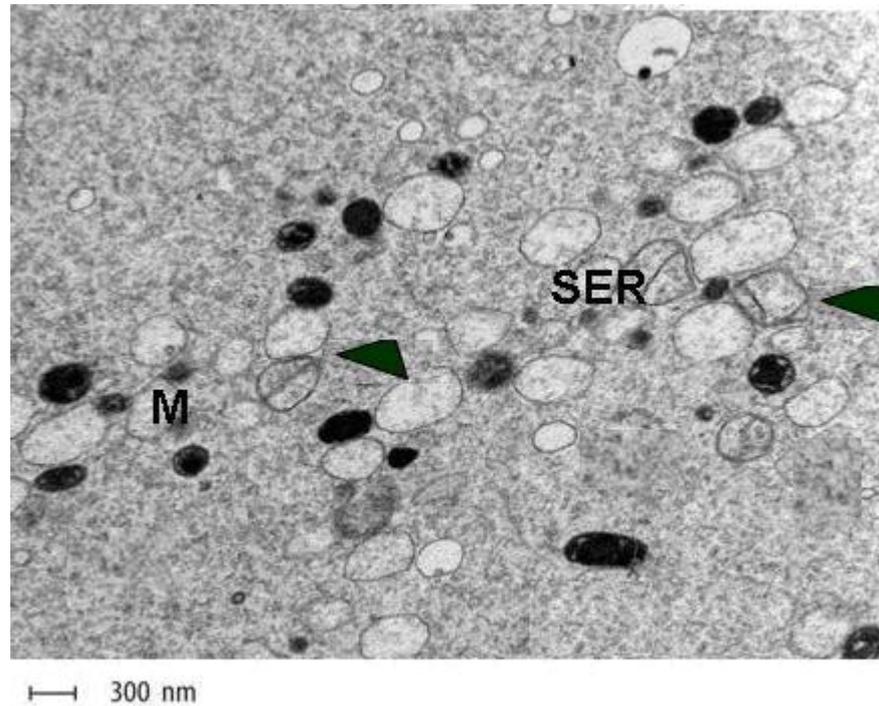


FIGURA 8B: Immagine al TEM di ovocita umano vitificato. I mitocondri si presentano danneggiati, con matrice svuotata (frecche verdi). M=mitocondri SER=vescicole di reticolo endoplasmatico.

Circa il 90% dei campioni presenta un raggruppamento di mitocondri soprattutto in prossimità delle vescicole di reticolo endoplasmatico liscio (SER) o delle cisterne tubulari di SER (fig 9A). E' stato visto inoltre che nel 10% dei campioni gli organelli citoplasmatici presentavano una certa redistribuzione nel citoplasma più profondo, lasciando una fascia pericorticale quasi del tutto priva di organelli (clearing del citoplasma corticale fig 10).

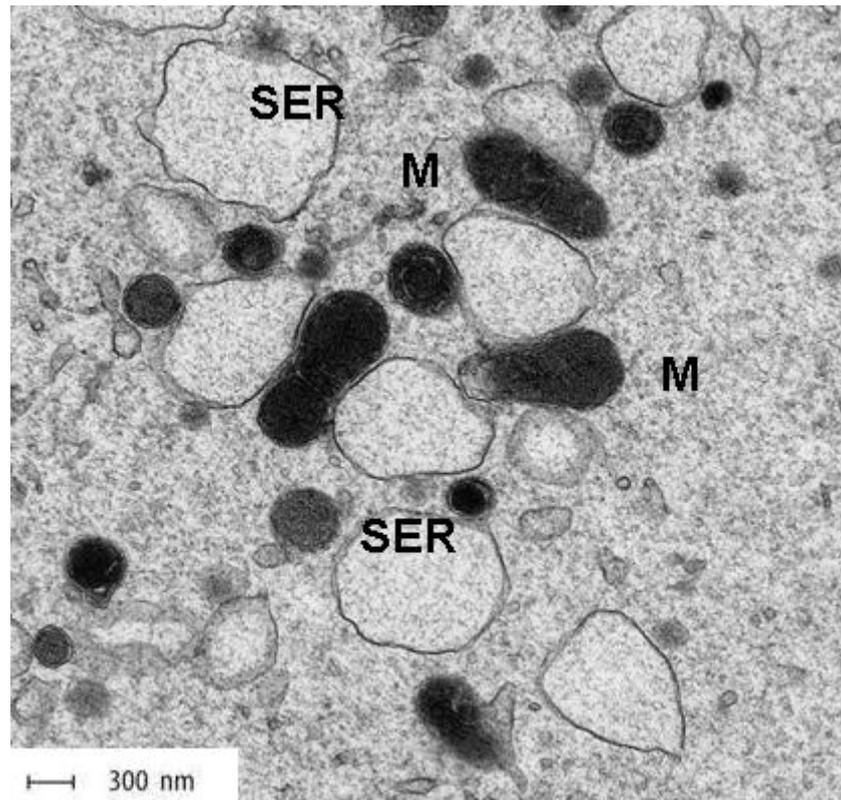


FIGURA 9A: Immagine al TEM di ovocita umano vitificato. I mitocondri sono addossati alle vescicole di reticolo le quali appaiono slargate. M=mitocondri SER= vescicole di reticolo endoplasmatico.

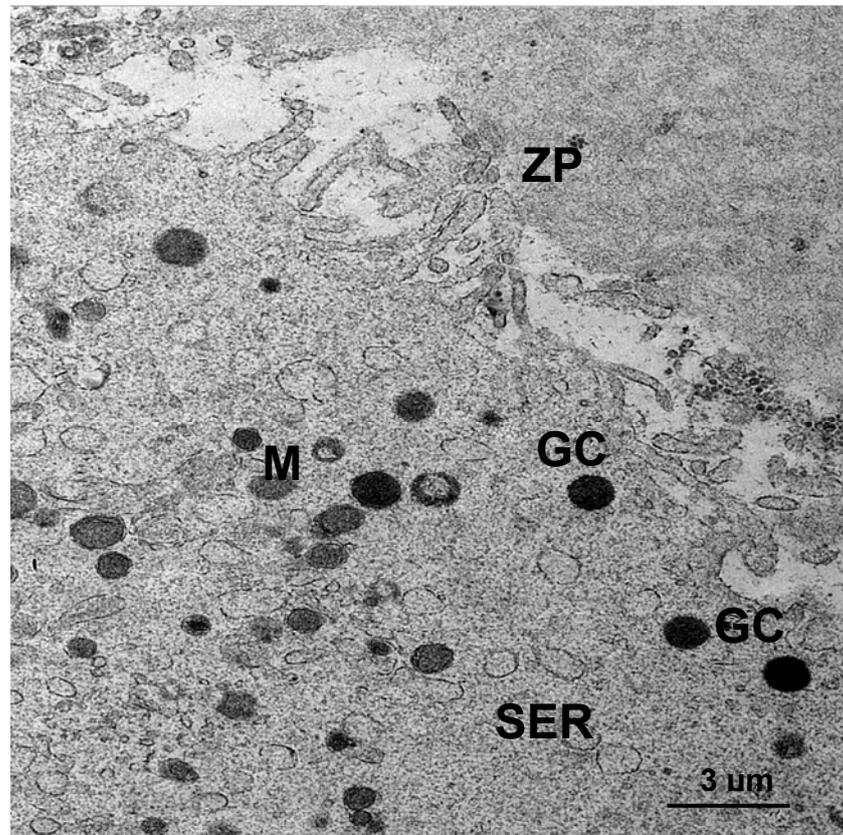


FIGURA9B: Immagine al TEM di ovocita umano vitificato
M= mitocondri SER=vescicole di reticolo endoplasmatico.

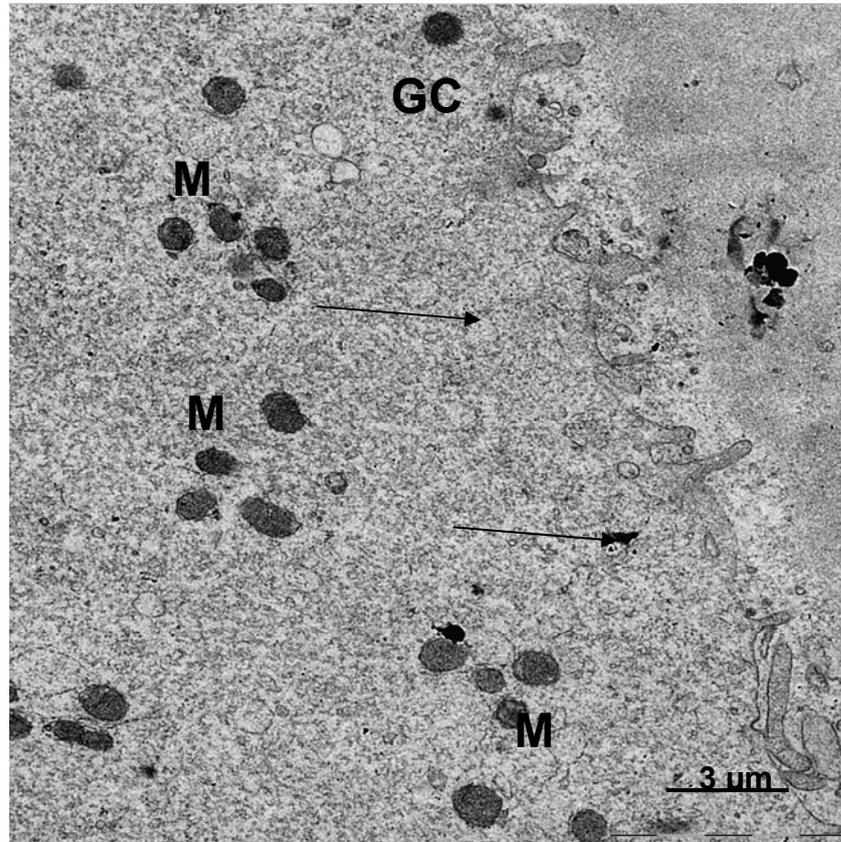


FIGURA 10: Immagine al TEM di ovocita umano vitrificato. Clearing di membrana con assenza di organelli (vedi frecce nere). M= mitocondri SER= vescicole di reticolo endoplasmatico.

Per quanto concerne la densità dei granuli corticali, questa risulta essere piuttosto variabile. Infatti si sono registrati valori che oscillano da 0 a 17 GC su 10 micron di profilo di membrana, con un valore medio di 4.89 ± 2.34 . Laddove sono presenti i GC sono disposti in singola fila lungo il profilo dell'olemma, mentre in molti casi sono visibili evidenti processi di esocitosi, infatti il loro contenuto lo si ritrova nello spazio extracellulare (11 A,B)

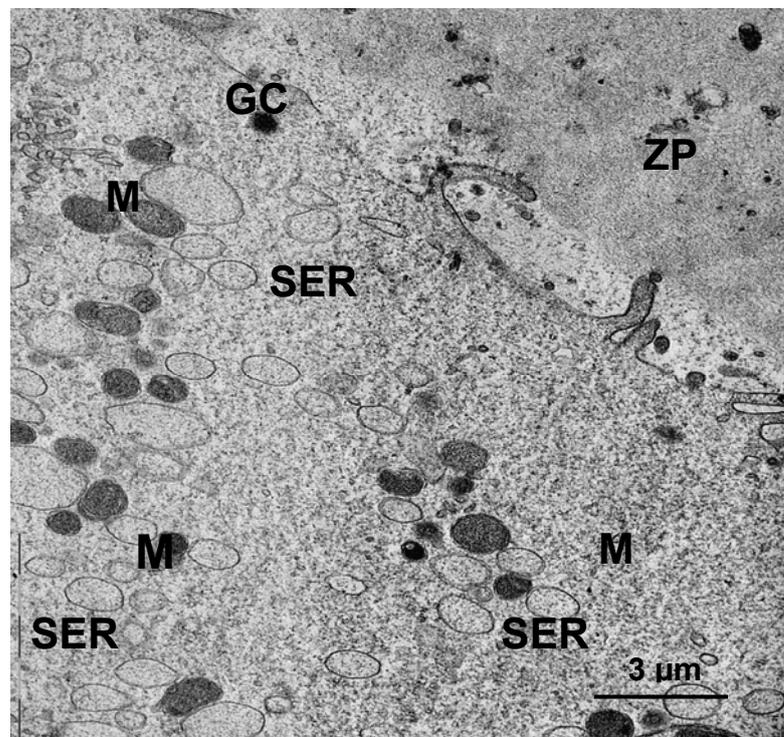
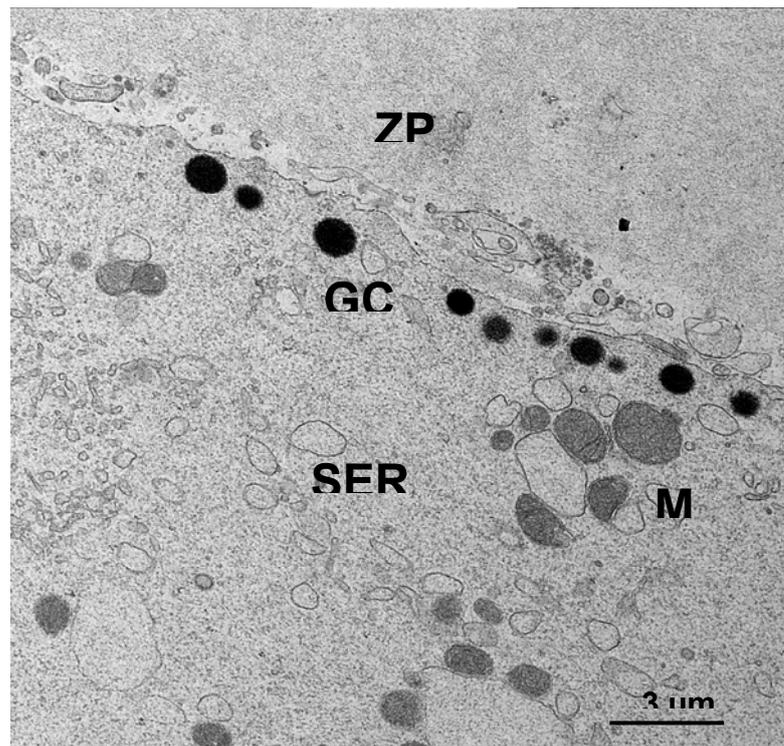


FIGURA 11 A,B: Immagine al TEM di ovocita umano vitrificato. Abbondanti GC (A) Assenza totale di GC (B). M= mitocondri SER= vescicole di reticolo endoplasmatico. GC= granuli corticali

Le vescicole di reticolo sembrano essere particolarmente rigonfie (fig 9 A), di fatto i valori di area media ottenuti lo rilevano: $0,109 \pm 0.054$ micron². In alcuni campioni si è riscontrata la presenza di zone particolarmente vacuolate: tale situazione si è verificata nel 33% dei campioni esaminati. Tutti i risultati ultrastrutturali sono riportati nella tabella 1 qui di seguito.

PARAMETRI	OVOCITI FRESCHI	OVOCITI SF 0.3M SACCAROSIO	OVOCITI VITRIFICATI IRVINE
N° ovociti trattati TEM	16	25	21
% sopravvivenza	-	76% (81/107)	82% (98/120)
Area media SER	$0.040 \text{ um}^2 \pm 0.02$	$0.084 \text{ um}^2 \pm 0.03$	$0.109 \text{ um}^2 \pm 0.054$
Min area SER	0.13 um^2	0.035 um^2	0.03 um^2
Max area SER	0.099 um^2	0.176 um^2	0.24 um^2
Media n°GC/10um (min/max)	10.30 ± 3.9 (5-18)	3.35 ± 1.94 (0-7.9)	4.89 ± 2.34 (0-17)
% micondri danneggiati	0%	71%	15%
Vacuoli	12.5%	64%	33 %
Organelli raggruppati	57%	64%	40 %
Clearing del citoplasma pericorticale	0%	52%	10%

TABELLA 1: parametri ultrastrutturali in ovociti freschi; congelati/scongelati con protocollo lento e vitrificati

Livelli di calcio ionico intracellulare in ovociti freschi in risposta a soluzioni di vitrificazione

Per individuare le probabili alterazioni di calcio ionico intracellulare indotto dalle soluzioni usate durante la vitrificazione, circa 30 ovociti freschi sono stati caricati con l'indicatore Fluo-AM e poi cimentati in presenza delle soluzioni di equilibratura e di vitrificazione. In tutti gli ovociti trattati la intensità di fluorescenza è aumentata dopo esposizione alle soluzioni contenenti crioprotettivi ma non in maniera eccessiva: gli incrementi massimi si sono registrati in media a 2 minuti dall'esposizione alla soluzione di equilibratura e 60 secondi dall'esposizione alla soluzione di vitrificazione. Difatto negli ovociti trattati in presenza di soluzione di equilibratura il RFI medio è di 0,61 con un picco massimo ottenuto dopo 2 minuti di circa 1.05 (fig 12 A,B). Dai 15 ovociti cimentati con soluzioni di vitrificazione si è ottenuto un valore di RFI pari a 0,55 con un picco massimo registrato dopo 38 secondi di circa 0.98 (fig 12 C,D).

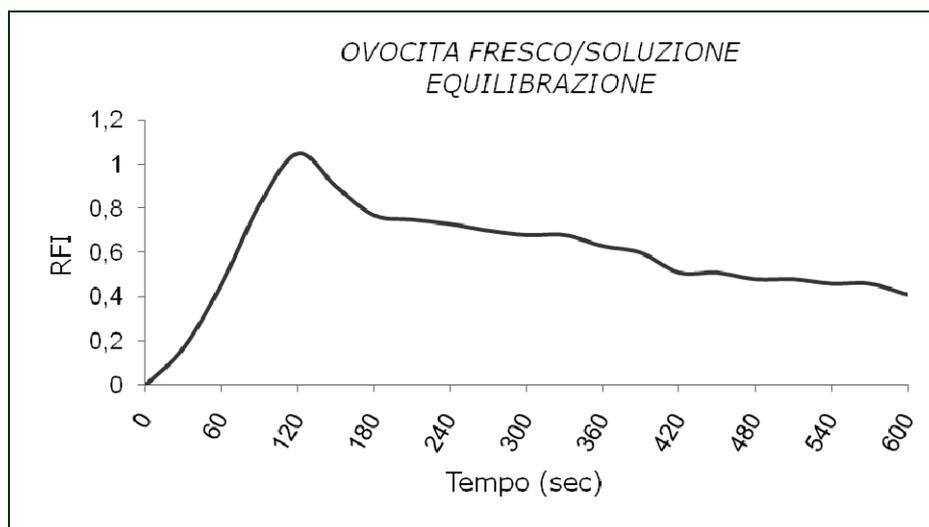
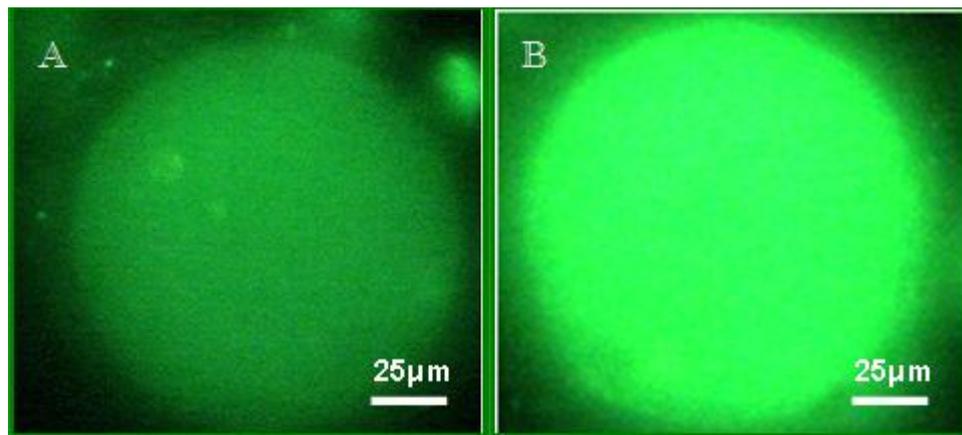


Figura 12: effetti della soluzione di equilibrare sui livelli di calcio intracellulare (A,B) e relativo RFI nel tempo

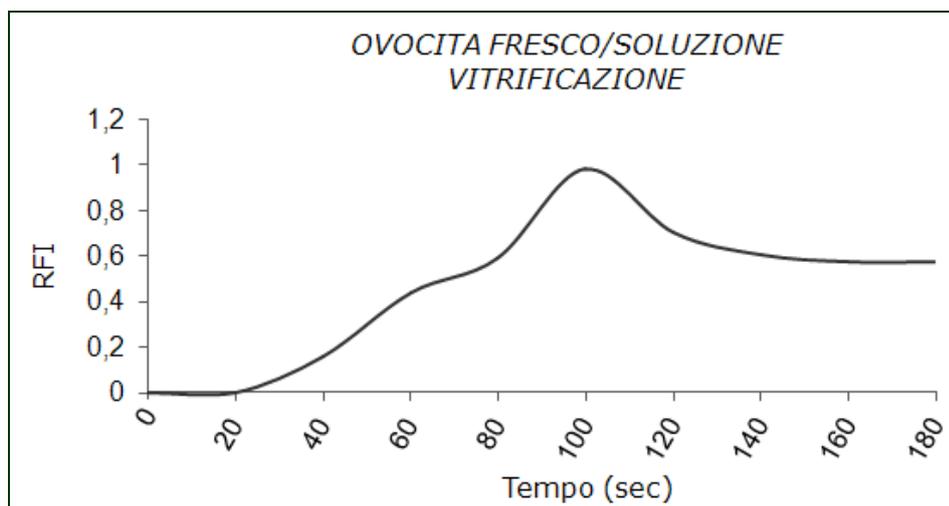
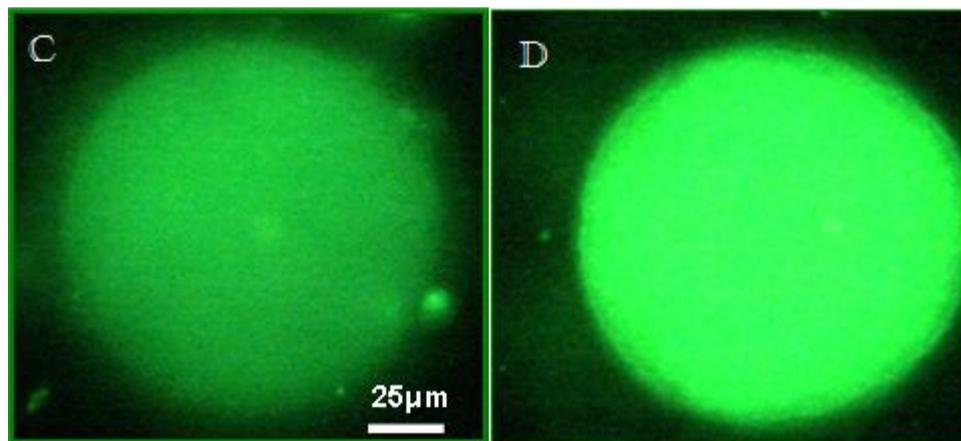


Fig 9: effetti della soluzione di vitrificazione sui livelli di calcio intracellulare (C,D) e relativo RFI nel tempo

I dati relativi agli incrementi massimi minimi e medi di intensità di fluorescenza relativa, sono riportati nella tabella qui di seguito

Trattamento	Valore medio RFI	Valore max	<i>Valore min</i>
Soluzione equilibrata	0.61	1.05 dopo 2'	0.80 dopo 1'30"
Soluzione vitrificazione	0,55	0.98 dopo 38"	0,13 dopo 68"

Tabella 2 RFI medio, max e min in ovociti freschi dopo trattamento con soluzione di equilibrata e vitrificazione

Effetti dello ionoforo A23187 sui livelli di calcio intracellulari in ovociti freschi e scongelati

Nei 12 ovociti freschi cimentati con ionoforo, l'incremento di RFI è risultato essere estremamente variabili con valori medi di 1,31 registrati dopo 70 sec dall'aggiunta dello ionoforo (fig 10 A,B). Negli ovociti scongelati 0,3 M saccarosio (circa 8 ovociti), il valore medio di RFI registrato è di 1,02, con un max e min rispettivamente di 0,69 e 1,35 (fig 10 C,D). Nel caso degli ovociti vitrificati, invece la capacità di risposta allo ionoforo è simile. In questo caso si è ottenuto un RFI medio di 1.05 con un max di 1,39 ed un min di 0,71 (fig 10 E,F). I valori ottenuti sono simili a quelli registrati per i campioni freschi, pertanto le differenze di RFI non risultano essere particolarmente significative.

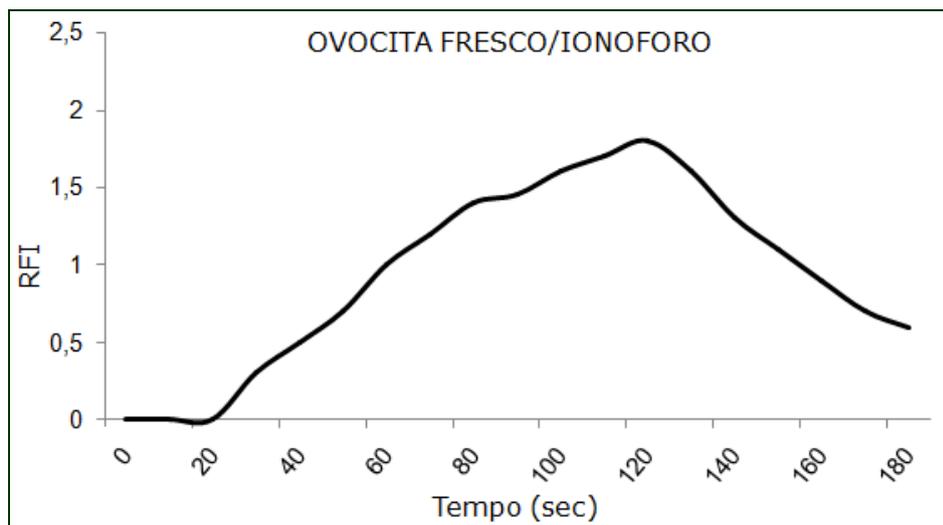
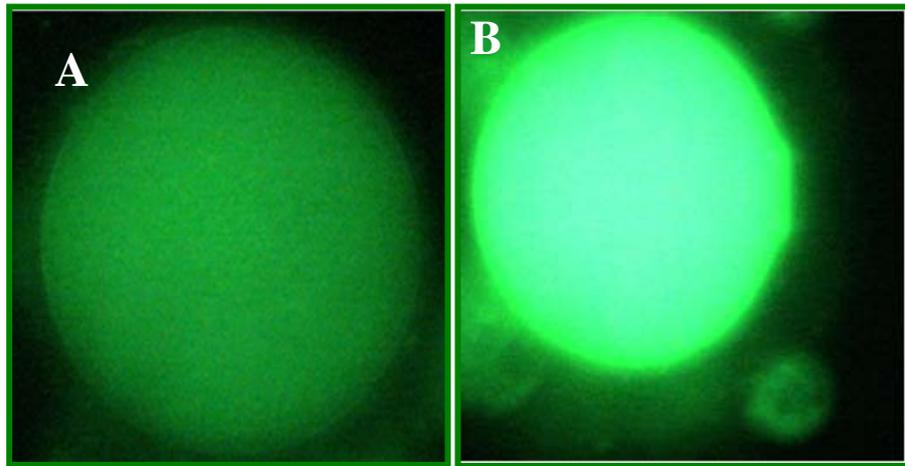


Fig 10: effetti dello ionoforo sui livelli di calcio intracellulare (A,B) e relativo RFI nel tempo, in ovociti freschi

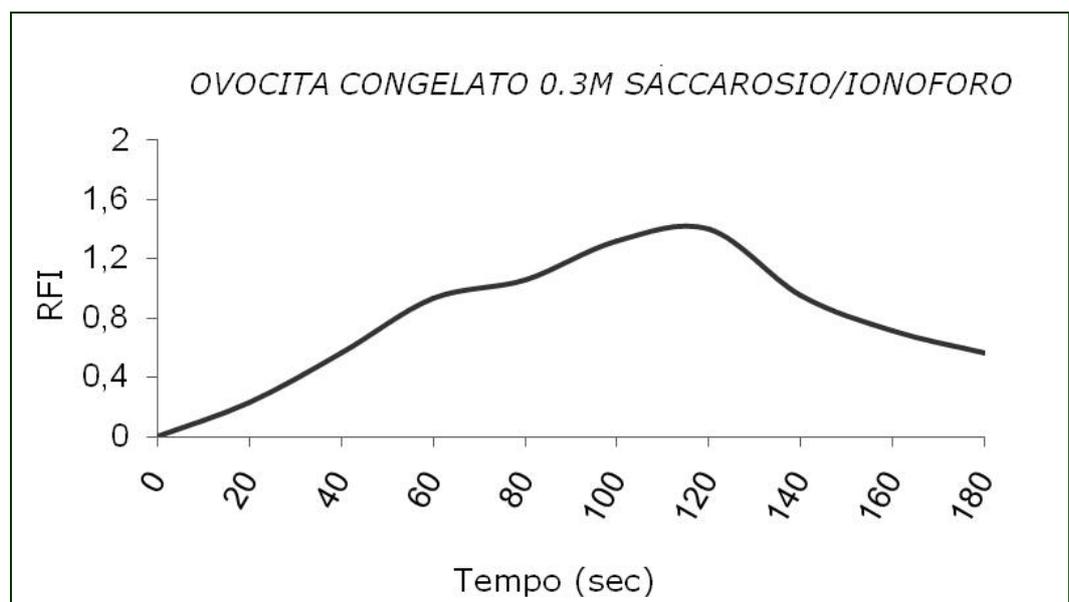
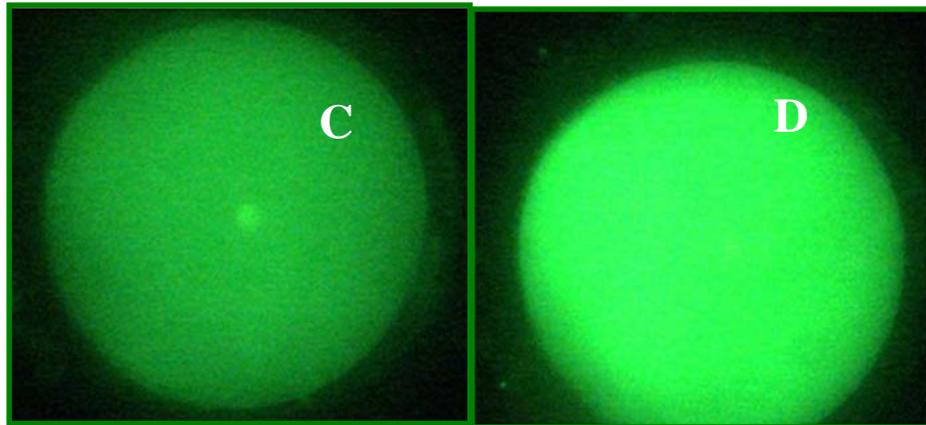


Fig 10: effetti dello ionoforo sui livelli di calcio intracellulare (C,D) e relativo RFI nel tempo, in ovociti congelati 0,3M saccarosio

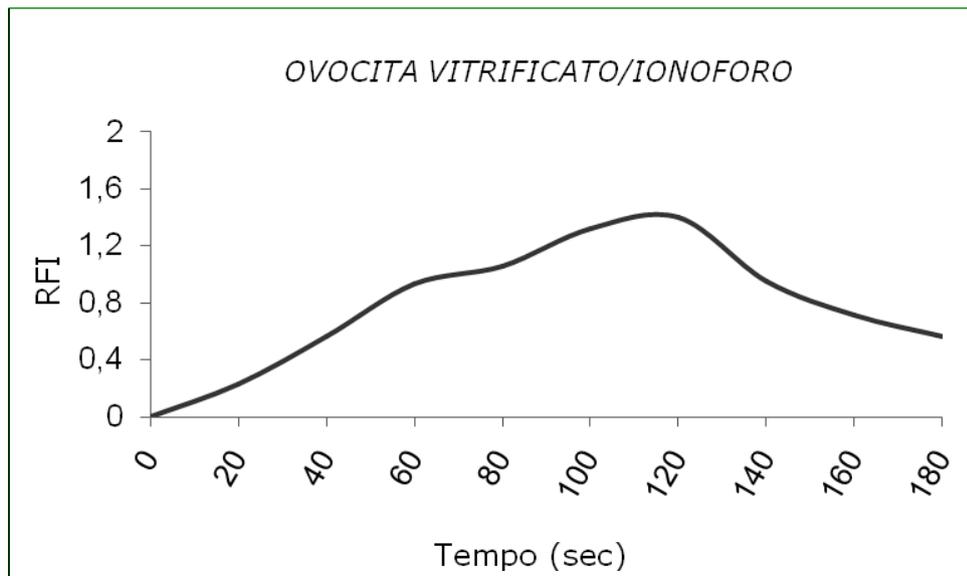
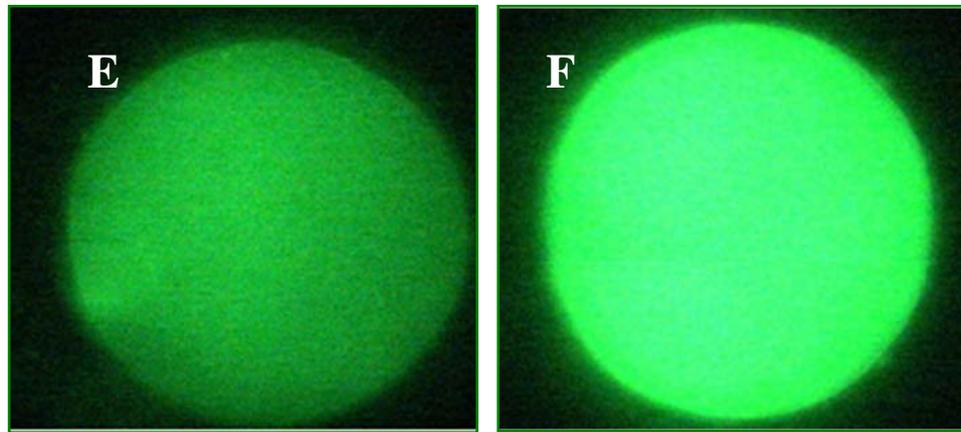


Fig 10: effetti dello ionoforo sui livelli di calcio intracellulare (E,F) e relativo RFI nel tempo, in ovociti vitrificati

Effetti dei singoli crioprotettivi sui livelli di calcio ionico intracellulare di ovociti freschi.

Nei 20 ovociti cimentati con i singoli crioprotettivi è emerso un quadro abbastanza chiaro. Così come accadeva per gli esperimenti in ovociti di topo, si è registrato che anche ovociti umani sono soggetti ad incrementi di calcio ionico intracellulare in presenza di propandiolo. In effetti i livelli di calcio aumentano sensibilmente quando lo ione è presente nel mezzo esterno, mentre l'aumento è più contenuto quando lo stesso viene sottratto. L'RFI% massimo registrato per il Pr-OH 1,5M con e senza calcio sono stati rispettivamente 248% e 149,5% (fig 11). Un comportamento analogo al propandiolo lo ha fatto registrare il DMSO al 15% (fig 12). Infatti anche in questo caso l'RFI percentuale massimo è nettamente 5 più alto in presenza di calcio anzichè in assenza (119% e 25,6%). Un comportamento diverso è stato registrato cimentando gli ovociti con EG al 15% (fig 13). Infatti, tale crioprotettivo, sembra essere insensibile alla presenza di calcio esterno, in quanto le curve di fluorescenza ottenute sono per lo più sovrapponibili (%RFI max: 152% calcio vs 143% calcium free). Tutto ciò indica che sia il Pr-OH che il DMSO sono responsabili non solo del rilascio ionico intracellulare, ma sono capaci anche di veicolare passivamente calcio dall'esterno. L'EG invece è responsabile solo della mobilitazione di calcio presente nelle riserve ovocitarie.

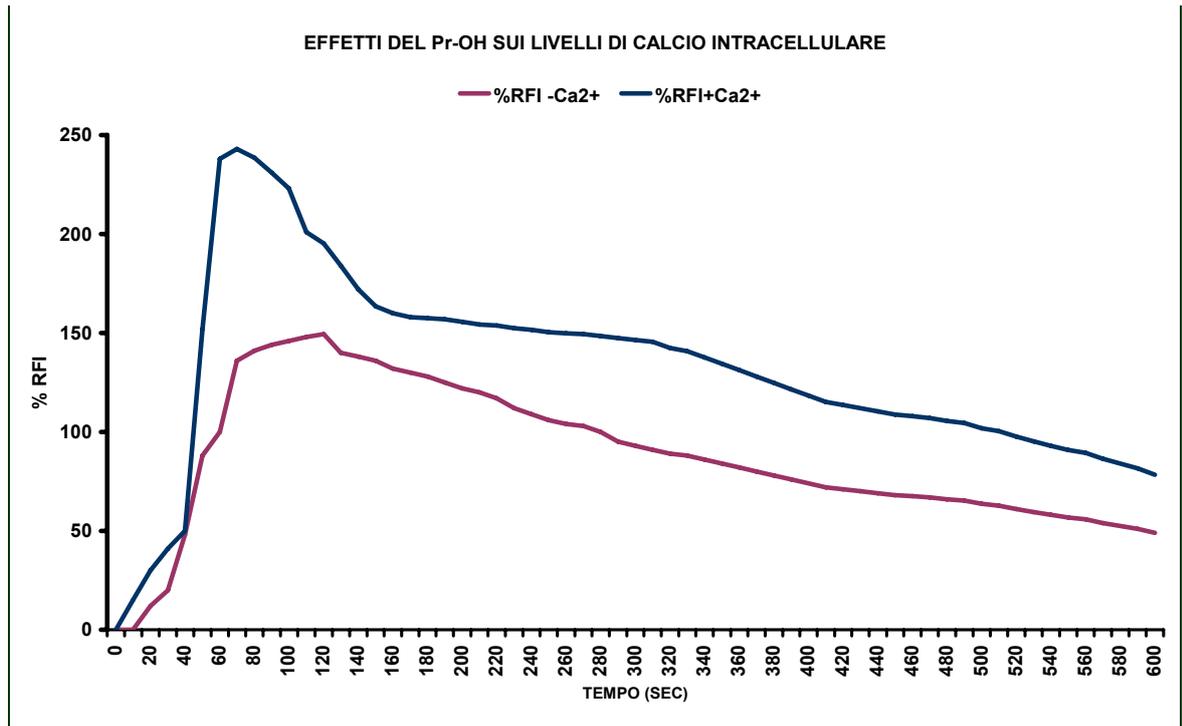


Figura 11: effetti del Pr-OH 1,5M sulle variazioni di calcio ionico intracellulare. Linea blu: in presenza di Ca⁺⁺esterno. Linea fucsia: in assenza di calcio esterno

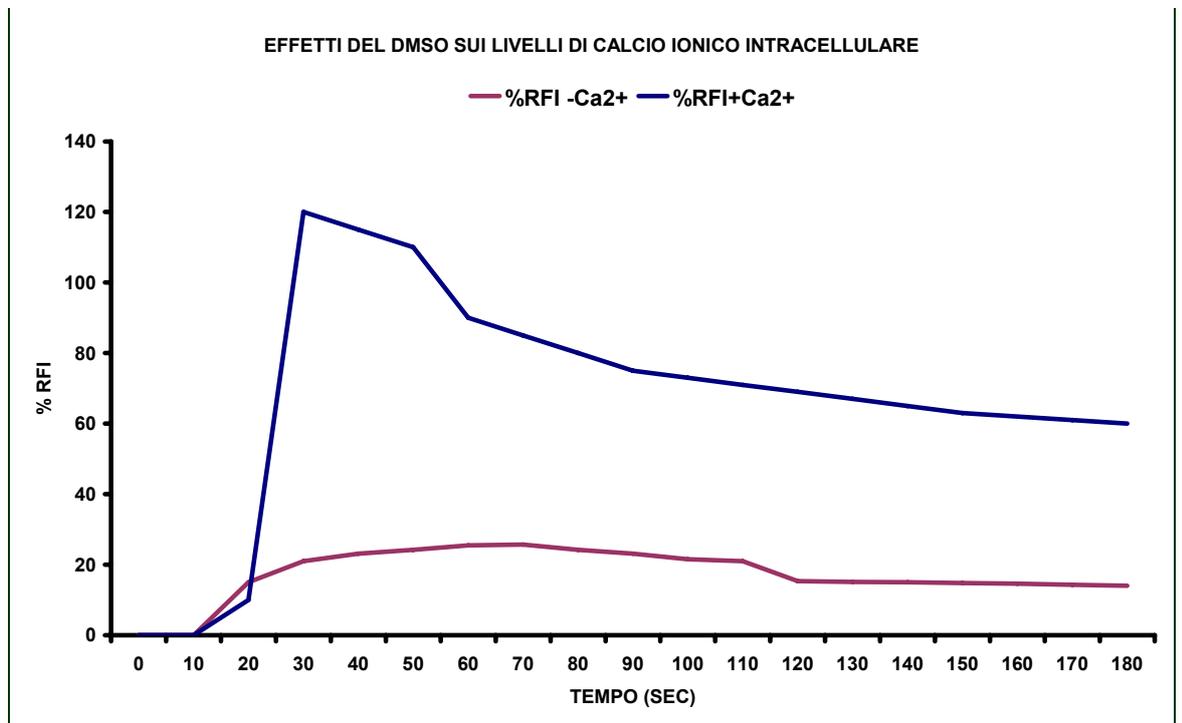


Figura 12: effetti del DMSO 15% sulle variazioni di calcio ionico intracellulare. Linea blu: in presenza di Ca^{++} esterno. Linea fucsia: in assenza di calcio esterno

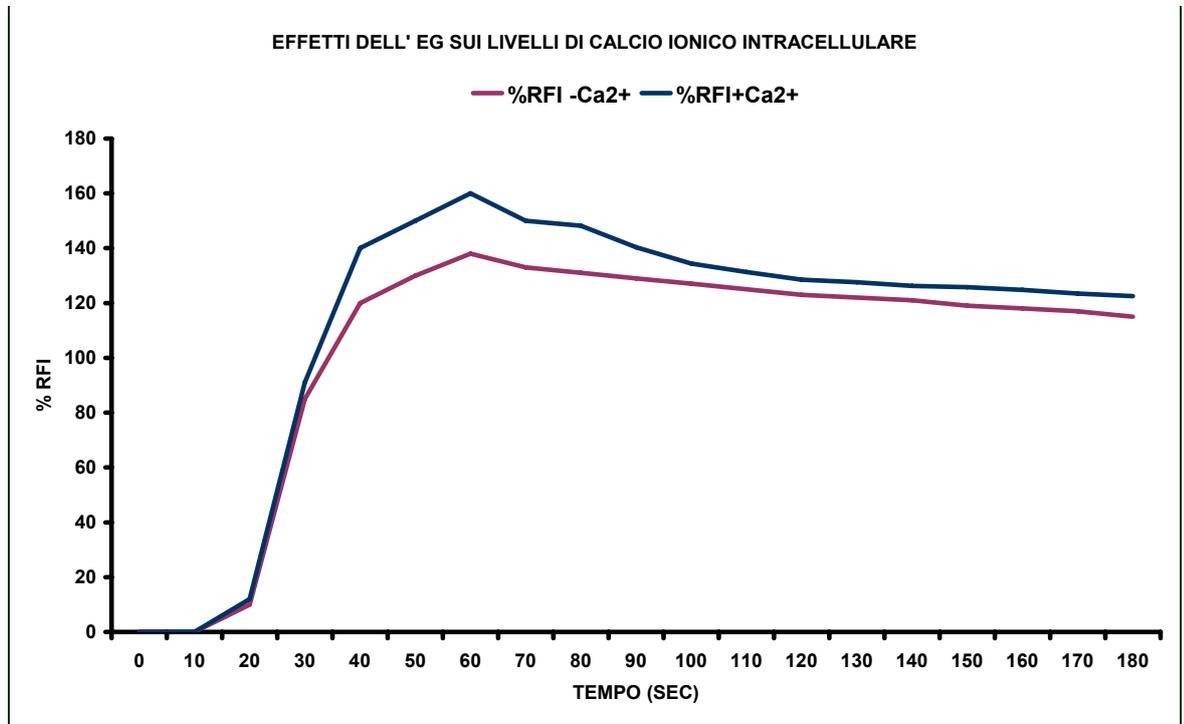


Figura 13: effetti dell' EG 15% sulle variazioni di calcio ionico intracellulare. Linea blu: in presenza di Ca^{++} esterno. Linea fucsia: in assenza di calcio esterno

Effetti della vitrificazione sui livelli di calcio ionico intracellulare in ovociti freschi

Al fine di visualizzare le variazioni di calcio ionico intracellulare che si presentano al momento della vitrificazione, l'intera metodica è stata eseguita aggiungendo ad ovociti freschi - precedentemente carichi con indicatore fluo 4AM- le varie soluzioni di congelamento a seconda dei tempi previsti dal

protocollo. Allo stesso tempo le oscillazioni di calcio venivano registrate mediante acquisizione time lapse. Si è visto che in corrispondenza dell'aggiunta delle varie soluzioni, a concentrazioni crescenti di crioprotettivi, vi è stato un aumento della %RFI. L'aumento dei livelli di calcio si è registrato sia in presenza che in assenza di calcio dal mezzo estero. Anche se, nel caso delle soluzioni contenenti calcio il valore di RFI percentuale è lievemente più alto, esso risulta essere non significativo.

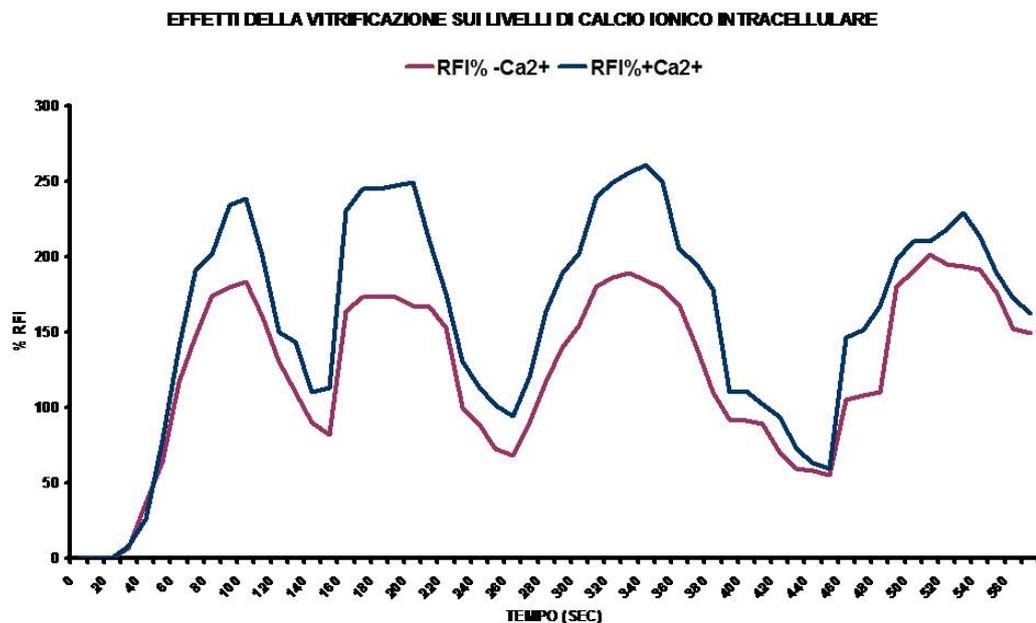


Figura 14: effetti del processo di vitrificazione sulle variazioni di calcio ionico intracellulare. Linea blu: in presenza di Ca⁺⁺ esterno. Linea fucsia: in assenza di calcio esterno

“TESSUTO OVARICO”

RISULTATI

RISULTATI

Analisi istologica

I campioni, vitrificati e sottoposti alla metodica di congelamento lento, secondo protocollo Li Yu-Bin o colina, sono stati fissati, inclusi in paraffina, tagliati al microtomo e colorati con Emallume-Eosina. Per ogni tipologia di campione, la presenza di eventuali danni a carico dei follicoli dovuti alla crioconservazione è stata valutata attraverso paragone diretto con campioni di controllo, che sono stati fissati per la microscopia ottica subito dopo il prelievo. Per l'analisi istologica, sono state prese in considerazione, in ciascun caso, 10 sezioni di vetrini differenti: è stato valutato sia il numero totale, sia la tipologia e la morfologia dei follicoli presenti.

Il numero di follicoli presenti nei diversi campioni umani è riportato qui di seguito (tabella 1 e nel grafico 1).

CAMPIONE	N°FOLLICOLI
Controllo	45
Congelamento lento secondo Li Yu-Bin	9
Congelamento lento secondo protocollo con colina	65
Vitrificazione secondo Li Yu-Bin	9
Vitrificazione secondo protocollo con colina	13

Tabella 1: numero di follicoli totali presenti nei differenti campioni di tessuto umano

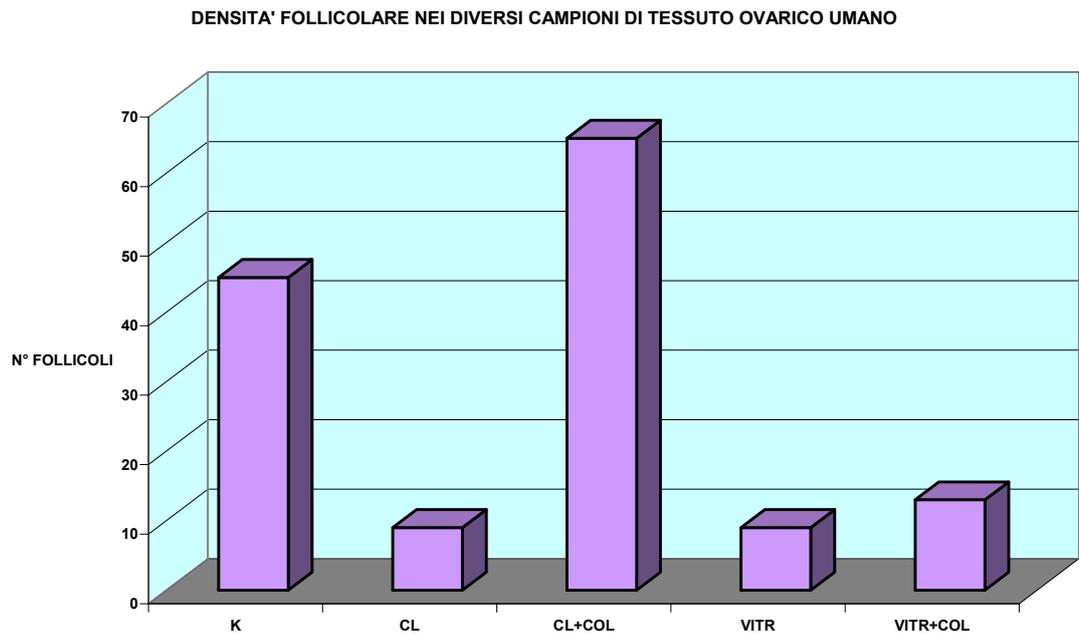


GRAFICO 1: numero di follicoli totali presenti nei differenti campioni di tessuto umano. K: controllo; CL: congelamento lento; CL+COL: congelamento lento + colina; VITR: vitrificazione; VITR+COL: vitrificazione + colina.

Tutti i follicoli presenti sono primordiali e primari, eccetto qualcuno di tipo secondario, osservato occasionalmente; talvolta sono stati ritrovati follicoli antrali. Come si può evincere dai risultati riportati, il numero di follicoli preservati nelle strip crioconservate secondo protocollo con colina è superiore rispetto a quello relativo alle strip sottoposte ai protocolli classici Li Yu-Bin, in particolar modo nel congelamento lento dove i valori rilevati sono prossimi a quelli del controllo.

Per ogni tipologia di campione, i follicoli sono stati classificati in tre gruppi, rispettivamente di grado 1, 2 e 3. I follicoli di

grado 1 sono di forma sferica, presentano cellule della granulosa distribuite uniformemente, citoplasma omogeneo e nucleo leggermente granulare, con cromatina condensata a formare una struttura densa e tondeggiante (Figura 1A). I follicoli di grado 2 presentano le stesse caratteristiche suddette, tuttavia le cellule della granulosa non rivestono regolarmente l'oocita, possono avere una forma irregolare e la cromatina condensata non è facilmente identificabile (Figura 1B). I follicoli di grado 3 sono caratterizzati dalla presenza di cellule della granulosa parzialmente o totalmente danneggiate, con citoplasma e nuclei picnotici (Figura 1C).

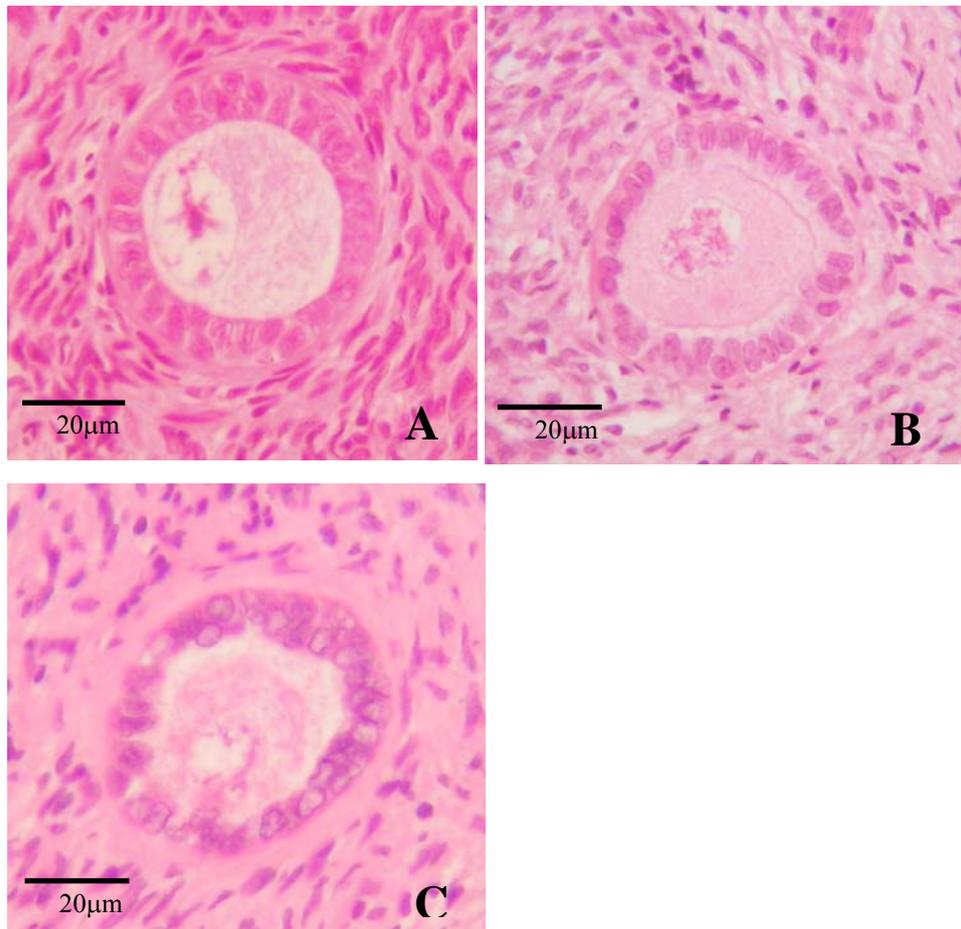


FIGURA 1: (A) Follicolo grado 1 (B) Follicolo grado 2 (C) Follicolo grado 3

Sono state elaborate le percentuali di follicoli di ogni gruppo per ciascun campione. I risultati ottenuti sono mostrati qui di seguito (tabella 2 e grafico 2).

	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Controllo	93,3	6,7	0
Congelamento lento secondo Li Yu-Bin	44,5	11,1	44,4
Congelamento lento secondo protocollo con colina	84,6	7,7	7,7
Vitrificazione secondo Li Yu-Bin	55,6	22,2	22,2
Vitrificazione secondo protocollo con colina	69,2	15,4	15,4

Tabella 2: Percentuali di follicoli di vario grado nei differenti campioni di tessuto umano

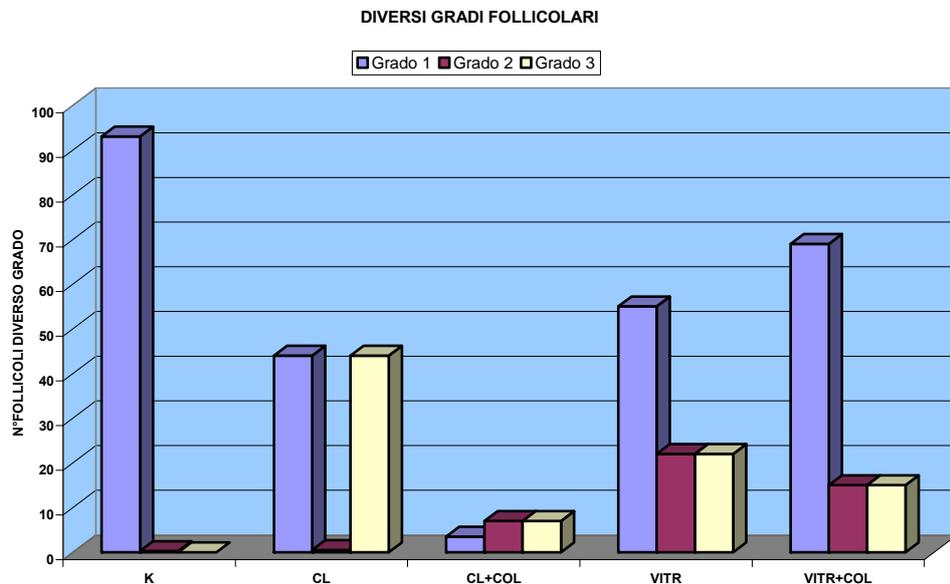


Grafico 2: Percentuali di follicoli di vario grado nei differenti campioni di tessuto umano

I follicoli di grado 1 e 2, considerati normomorfi, sono in percentuale nettamente superiore nel congelamento lento laddove il cloruro di sodio è stato sostituito dalla colina nel mezzo base, mentre il numero di follicoli in degenerazione e quindi di grado 3 è senza dubbio più basso. In particolare, dopo congelamento lento secondo protocollo con colina, si ha un 84.6% di follicoli di grado 1 ed un 7.7% di follicoli di grado 3, rispettivamente contro il 44.5% ed il 44.4% del protocollo senza colina.

Da un'osservazione dettagliata della morfologia (Figura 2), si osserva che lo stroma, in termini di densità cellulare, si preserva in maniera ottimale solo dopo congelamento lento con colina (Figura 2C); negli altri campioni (Figura 2B-D-E), infatti, il connettivo risulta essere molto lasso, paragonato a quello del campione controllo (Figura 2A). Inoltre, per quanto riguarda la struttura follicolare, nei campioni crioconservati con colina (Figura 2C-E), rispetto a quelli trattati secondo protocollo Li Yu-Bin (Figura 2B-D), la vescicola germinativa appare di forma sferica e dai contorni regolari, con cromatina condensata e facilmente identificabile, e le cellule follicolari rivestono in maniera uniforme l'ovocita.

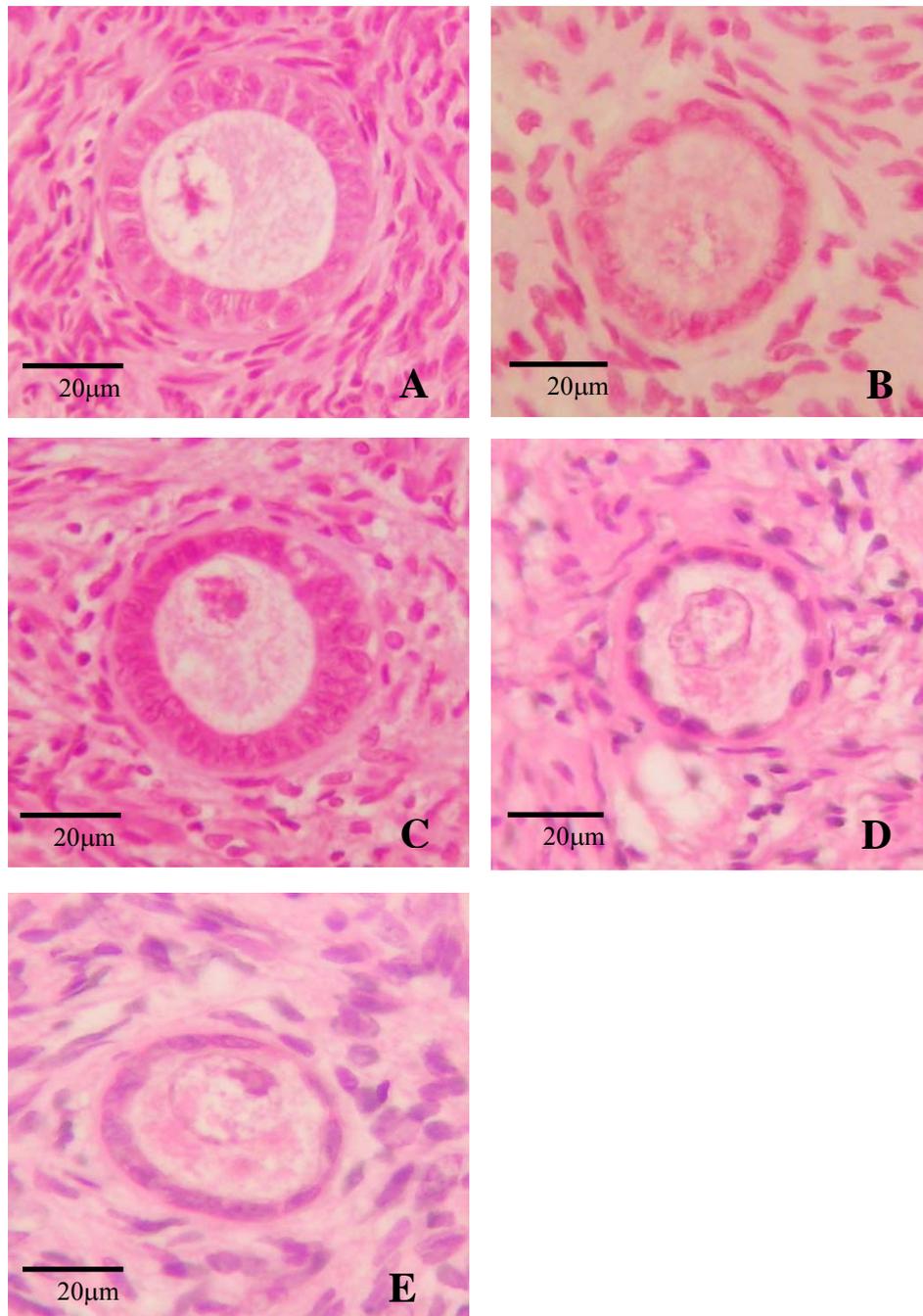


Figura 2: (A) Controllo, (B) congelamento lento Li Yu-Bin, (C) congelamento lento colina (D) vitrificato Li Yu-Bin, (E) vitrificato con colina

Il dato interessante è la presenza di follicoli antrali nel tessuto vitrificato con colina (Figura 3B), con caratteristiche morfologiche simili a quelle dei follicoli nello stesso stadio del controllo (Figura 3A).

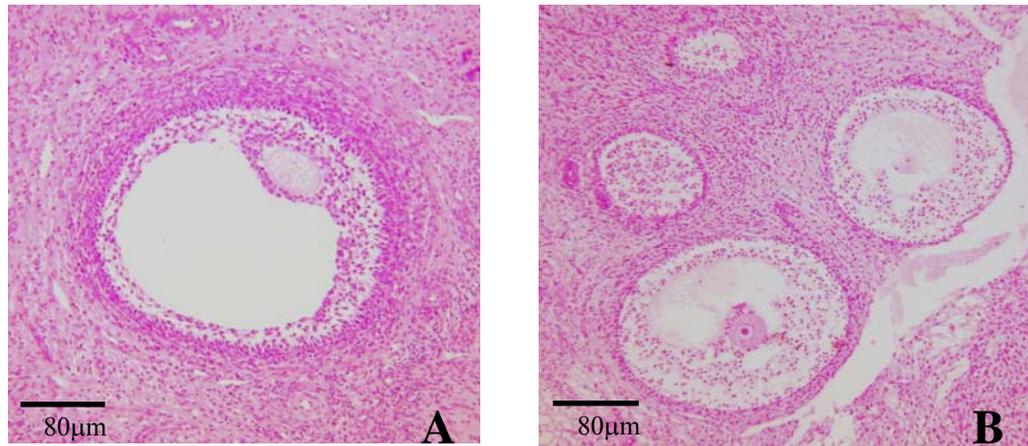


Figura 3: (A) Controllo, (B) vitrificato con colina

Valutazione ultrastrutturale

I differenti campioni in esame (vitrificati e sottoposti alla metodica di congelamento lento, secondo protocollo Li Yu-Bin o colina) sono stati processati per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione. Come per la microscopia ottica, nei tessuti criopreservati la presenza di eventuali danni a carico dei follicoli è valutata mediante raffronto con campioni di controllo, che sono stati fissati subito dopo il prelievo. La valutazione ultrastrutturale è stata effettuata analizzando morfologicamente i follicoli sulla base di parametri quali: integrità della membrana basale; qualità e posizione degli organelli, in particolare dei mitocondri; qualità della cromatina, del citoplasma e dello stroma

(Gualtieri et al., 2008). Tutti i follicoli osservati sono primordiali; non si apprezzano strutture in un differente stadio di sviluppo. L'analisi ultrastrutturale evidenzia che, il campione di controllo (Figura 4A) mostra cellule follicolari appiattite, membrana basale integra, mitocondri tondeggianti e provvisti di un numero ridotto di creste (Figura 4B), membrane cellulari regolari con interdigitazioni evidenti, nuclei con cromatina condensata, citoplasma uniforme.

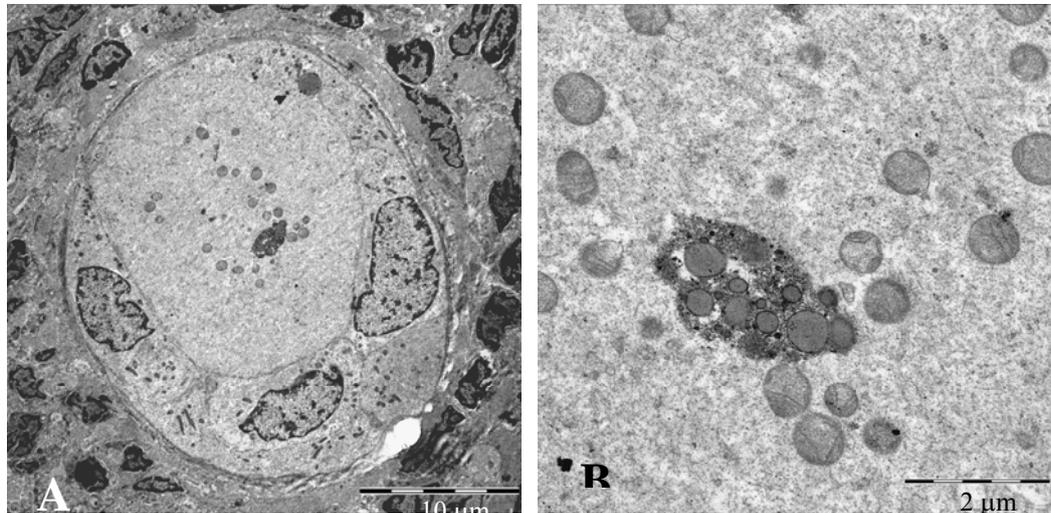


Figura 4: (A) Controllo, (B) ultrastruttura mitocondriale del campione di controllo

I tessuti vitrificati con entrambi i protocolli presentano cellule follicolari e oociti con vescicole, vacuoli e gocce lipidiche non presenti nel controllo. Ciononostante, i follicoli vitrificati con colina, (Figura 5C e 5D) a differenza di quelli vitrificati secondo protocollo Li Yu-Bin (Figura 5A e 5B), mancano di ampi spazi intercellulari tra cellule follicolari e presentano mitocondri di forma regolare e strutture lipidiche ben conservate, in particolare sono visibili lamelle anulate.

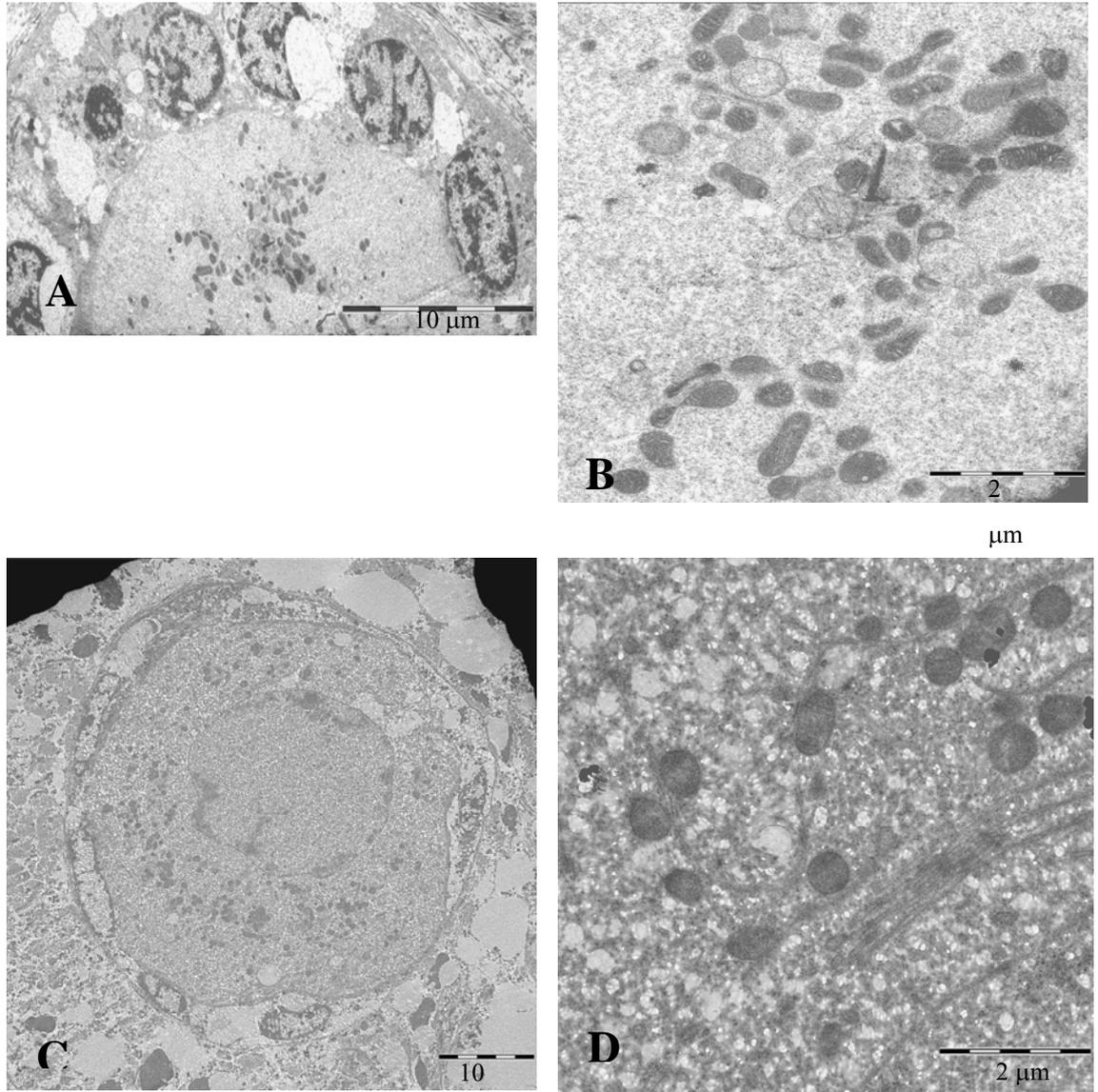


Figura 5 (A) Vitrificato Li Yu-Bin, (B) ultrastruttura mitocondriale del campione vitrificato Li Yu-Bin, (C) vitrificato con colina, (D) ultrastruttura mitocondriale del campione vitrificato con colina.

Infine, i follicoli sottoposti congelamento lento con entrambi i protocolli (Figura 6) presentano: una membrana basale intatta, cellule follicolari con membrane ben preservate e cromatina decondensata, e mitocondri con forma irregolare e matrice lassa. Tuttavia, i campioni sottoposti a congelamento lento con colina (Figura 6C e 6D), a differenza di quelli sottoposti a congelamento

lento secondo protocollo Li Yu-Bin (Figura 6A e 6B), presentano un citoplasma omogeneo sia nell'ocita che nelle cellule follicolari, un oolemma continuo e una vescicola germinativa con membrana ben distinguibile. Inoltre, come già osservato nella vitrificazione con colina, in tali campioni sono visibili lamelle anulate.

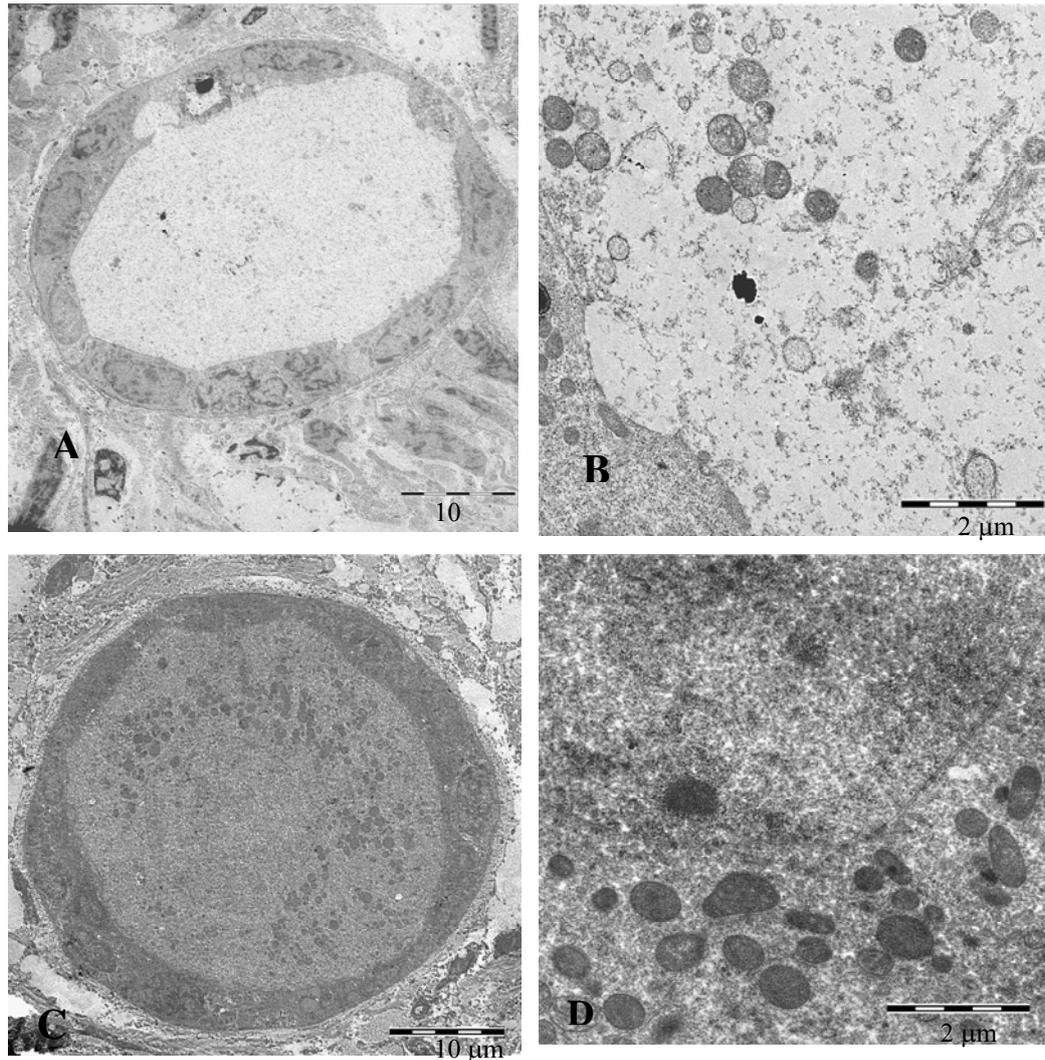


Figura 6: (A) Congelamento lento Li Yu-Bin, (B) ultrastruttura mitocondriale del campione sottoposto a congelamento lento Li Yu-Bin, (C) Congelamento lento con colina, (D) ultrastruttura mitocondriale del campione sottoposto a congelamento lento con colina

Valutazione morfologica e analisi di vitalità dei follicoli isolati

Al fine di definire un protocollo ottimale per l'isolamento dei follicoli, sono state saggiate metodiche che differivano sia per la modalità di taglio del cortex ovarico, che per quella di blocco della digestione enzimatica. I migliori risultati, in termini numerici e morfologici, si sono ottenuti riducendo la porzione corticale in frammenti 0.5mm x 0.5mm x 0.5 mm, mediante l'utilizzo di un affilato bisturi e blocco della digestione con l'aggiunta di un egual volume di FBS al 100% (Fig. 8). Frammenti di dimensioni maggiori, provvisti pertanto di una porzione midollare più spessa, non venivano digeriti completamente, rilasciando quindi un numero di follicoli isolati significativamente inferiore. Invece, il blocco della digestione con dPBS addizionato del 40% di FBS, seguito o meno da centrifuga, comportava un danneggiamento meccanico dei follicoli, che si presentavano allo stereomicroscopio ricchi di estroflessioni della membrana plasmatica, segni di degenerazione cellulare (Fig.7)

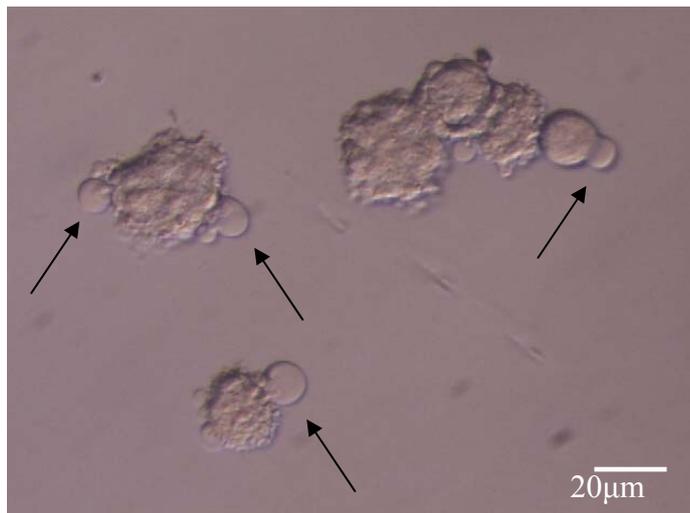


Figura7: Follicoli ottenuti dopo il blocco della digestione con dPBS più FBS 40% e centrifuga

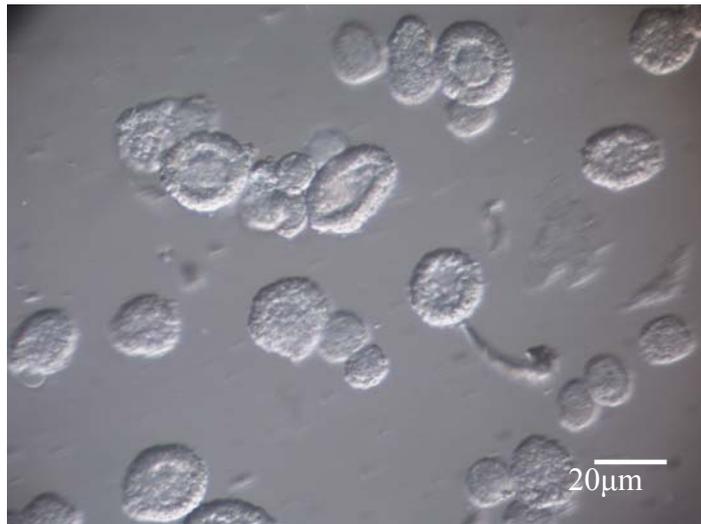
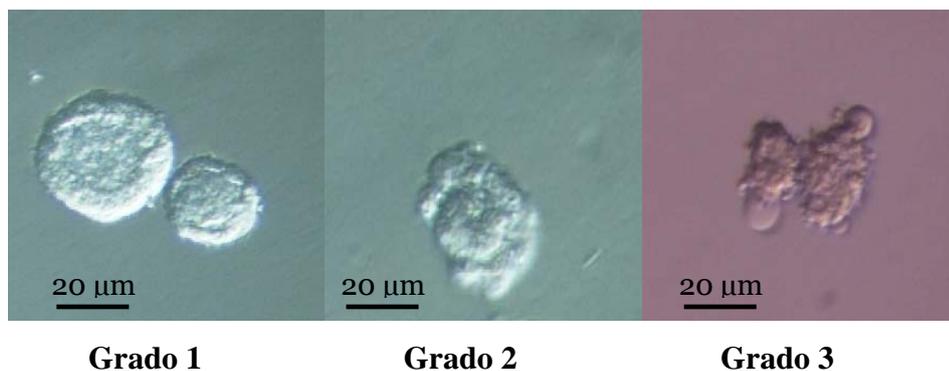


Figura 8: Follicoli ottenuti dopo il blocco della digestione con FBS 100%

Analogamente a quanto fatto precedentemente, si è proceduto ad un'analisi morfologica su un campione random di 100 follicoli. In relazione alla distribuzione delle cellule follicolari ed omogeneità della membrana cellulare, i follicoli sono stati classificati in tre gruppi



Le percentuali di follicoli appartenenti ad ogni gruppo sono state riportate rispettivamente nella tabella seguenti (Tab 3).

	Grado 1	Grado 2	Grado 3
% Follicoli ottenuti con il I blocco	25	30	45
% Follicoli ottenuti con il II blocco	20	30	50
% Follicoli ottenuti con il III blocco	80	15	5

Tabella 3: % follicoli di diverso grado

Analisi della vitalità follicolare

Su un campione random di 30 follicoli appena isolati veniva eseguita l'analisi di vitalità, mediante piastratura degli stessi e doppia colorazione con ioduro di propidio e Hoechst 33342. Lo ioduro di propidio penetra esclusivamente le membrane destabilizzate, legandosi al DNA ed identificando così le cellule morte che appaiono rosse (Fig. 9 A- 10 A) mentre l'Hoechst 33342 colora con intensità differente sia cellule vive che morte di blu (Fig.9 B- 10 B).

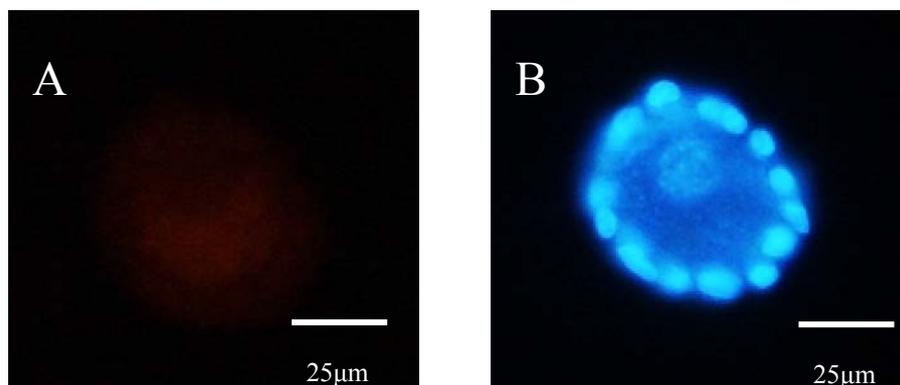


Figura 9: Follicolo isolato vitale trattato con Ioduro di propidio (A) e Hoechst 33342 (B)

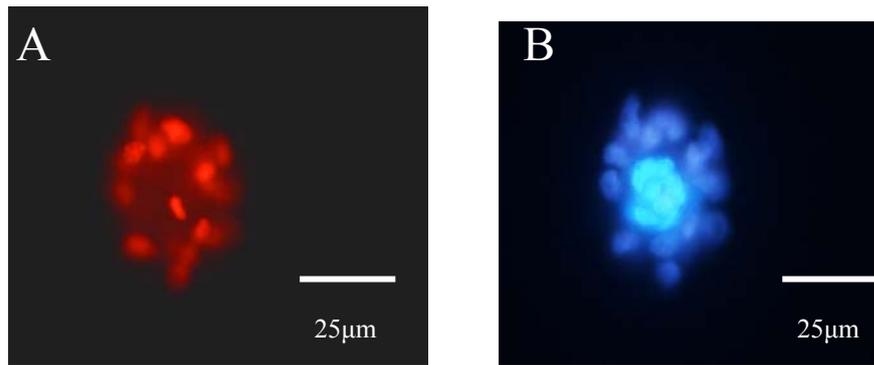


Figura 10 : Follicolo isolato non vitale trattato con Ioduro di propidio(A) e Hoechst 33342 (B)

Nella quota di follicoli considerati vitali sono ritenuti tali anche quei follicoli con ovocita vivo ed un numero di cellule follicolari morte inferiore al 50 %.

I valori di vitalità relativi ai follicoli ottenuti con i tre differenti metodi di digestione enzimatica sono riportati nella tabella 4.

	% di follicoli vitali	% di follicoli non vitali
I blocco	40	60
II blocco	32,5	67,5
III blocco	91	9

Tabella4: % di follicoli vitali e non vitali ottenuti dopo il blocco della reazione enzimatica.

Coltura follicoli

A seguito dell'isolamento, parte dei follicoli veniva trasferita direttamente in mezzo di coltura, al fine di seguirne e valutarne l'accrescimento in vitro. Il terreno di coltura utilizzato era, MEM, supplementato con FCS 20%, 0.47mM acido piruvico, 1% Insulin-transferrin-selenium. A giorni alterni si effettuavano i cambi del mezzo di coltura e si controllavano la morfologia e l'accrescimento follicolari mediante l'utilizzo di un software, NIS (Nikon).

Dopo 10 giorni di coltura (Fig 11 A), i follicoli presentano un maggiore accrescimento rispetto al loro volume al giorno 5 e 0 (rispettivamente Fig. 11 B, A)

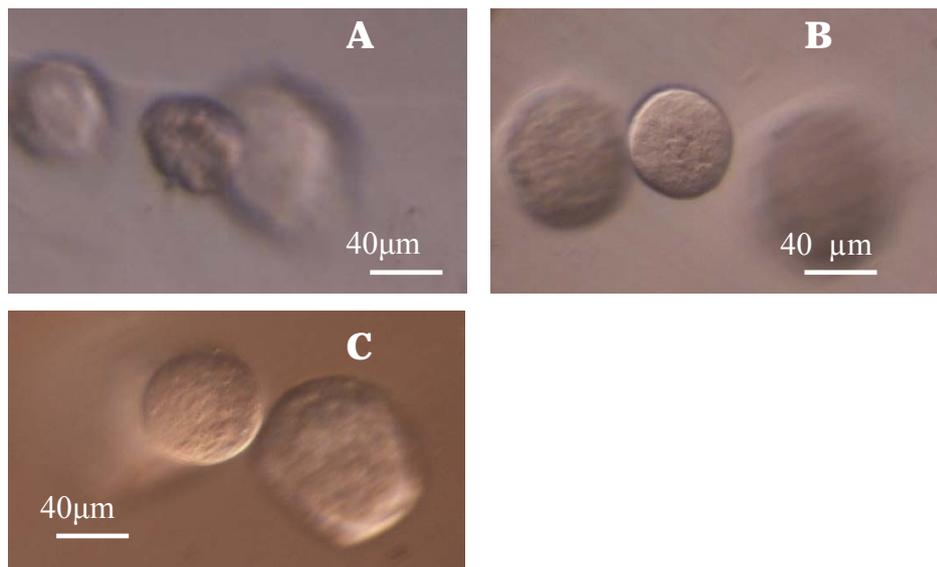


Fig. 11 follicoli in coltura al giorno 0 (A), 5 (B), e 10 (C) post isolamento.

Infatti, si verifica un accrescimento medio del 44%, in quanto il diametro medio dei follicoli passa da $117,02\mu\text{m} \pm 45$ a $206,11\mu\text{m} \pm 69$.

Tali dati sono confermati dalle analisi di vitalità al giorno 10 di coltura: la morfologia può essere quindi considerato un indice di vitalità. Infatti, i follicoli dopo 10 giorni di coltura si presentano per il 70% vitali (fig 12 A,B).

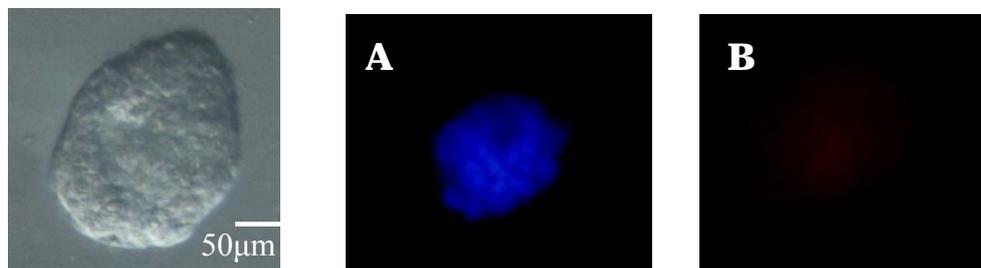


Figura 12: Follicolo al decimo giorno di coltura analizzato mediante Hoechst 33342 (A) e Ioduro di propidio (B)

Vitrificazione dei follicoli

I follicoli isolati venivano vitrificati, seguendo il medesimo protocollo già illustrato per gli ovociti, direttamente in cryotip. Il recupero dei follicoli nei vari passaggi risulta particolarmente difficile, date le ridotte dimensioni follicolari.

Allo scongelamento, i follicoli venivano analizzati morfologicamente e poi sottoposti al test di vitalità, per verificare eventuali danni dovuti alla crioconservazione.

Ancora una volta i test di vitalità confermano i dati morfologici. Infatti, allo scongelamento, dopo 1h di incubazione in mezzo di

coltura a 37 °C, i follicoli vitrificati in presentano una buona morfologia ed una percentuale di vitalità pari al 48% (Fig.13)

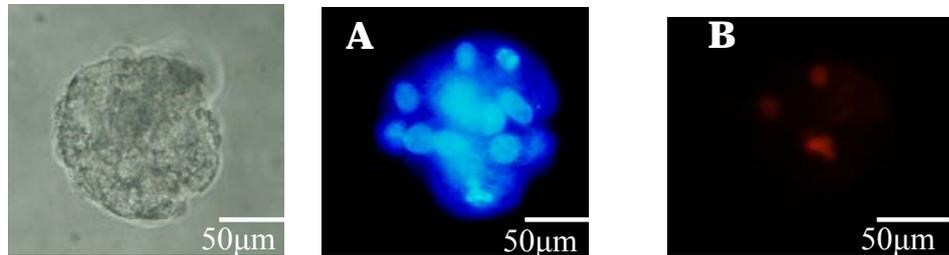


Fig.13: follicolo vitrificato/scongelato analizzato mediante Hoechst 33342 (A) e Ioduro di propidio (B)

La percentuale di sopravvivenza allo scongelamento era superiore allorché i follicoli, dopo isolamento venivano tenuti per qualche giorno in coltura prima di procedere alla vitrificazione degli stessi. Infatti al termine della coltura di 4-5 giorni circa, tutti i follicoli venivano vitrificati; di questi una parte veniva sottoposta immediatamente ad analisi di vitalità (Fig.14), la restante parte veniva posta in coltura per altri 5 giorni, per verificare la ripresa dell'accrescimento follicolare.

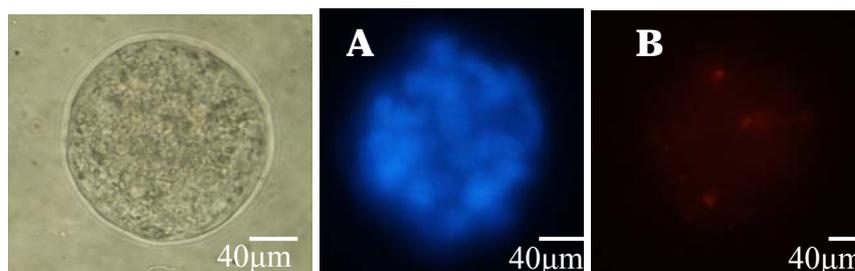


Fig. 14: follicolo vitrificato dopo 5 giorni di coltura e analizzato subito dopo scongelamento mediante Hoechst 33342 (A) e Ioduro di propidio (B)

A questo punto venivano analizzate nuovamente le dimensioni e la vitalità: i follicoli presentavano un accrescimento medio del 10% e una vitalità del 59% (Fig. 15).

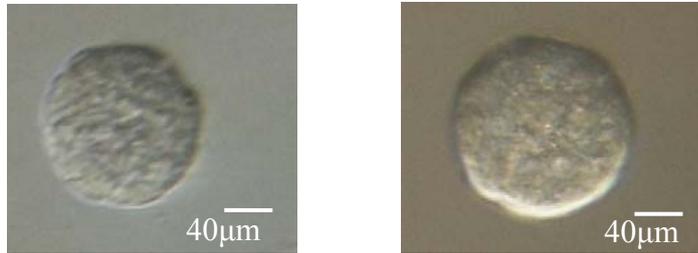


Fig. 15: follicolo dopo 5 giorni di coltura post-scongelo

**“OVOCITI”
DISCUSSIONE E
CONCLUSIONI**

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel nostro Paese la sterilità di coppia è diventato un fenomeno piuttosto diffuso, con un'incidenza circa del 10-15%. Di conseguenza molti sono stati i progressi effettuati nell'ambito delle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA), al fine di migliorare le rese percentuali. In Italia le tecniche di PMA sono disciplinate da 5 anni or sono, dalla legge N°40 del 20 febbraio 2004, la quale, tra le varie limitazioni, impone il divieto assoluto di effettuare fecondazione eterologa, di attuare sperimentazione su zigoti ed embrioni, di criopreservare embrioni, di effettuare diagnosi genetica preimpianto e di inseminare più di 3 ovociti per ogni ciclo di fecondazione in vitro. In realtà tali limitazioni abbassano il numero di embrioni prodotti; impediscono la selezione di quelli che hanno maggiore probabilità di nascita a termine, riducono le percentuali di gravidanza rispetto alla situazione pre-legge, e, soprattutto, aumentano il numero di stimolazioni ormonali della crescita follicolare multipla ed i pick-up ovocitari a cui deve essere sottoposta la donna infertile per concepire in vitro.

Dal momento che la stimolazione ormonale della crescita follicolare multipla produce mediamente molto più di tre ovociti, tale legge ha introdotto la possibilità di criopreservare gli ovociti sovranumerari e ha esplicitamente incoraggiato il loro utilizzo a fini di ricerca previo appropriato consenso informato scritto da parte delle pazienti.

In linea generale gli ovociti soprannumerari potrebbero essere congelati, scongelati ed inseminati sempre in un numero massimo di tre in caso di insuccesso del precedente tentativo di

fecondazione o di trasferimento embrionale. In tal modo non solo si ridurrebbe lo stress psico-fisico a cui è sottoposta la donna nelle procedure di fecondazione assistita, ma inoltre la criopreservazione ovocitaria permetterebbe di evitare gli indiscutibili problemi etico-legali collegati alla criopreservazione degli embrioni. Inoltre il congelamento ovocitario permetterebbe di preservare la fertilità in giovani donne sottoposte a terapie anti tumorali; permetterebbe di posticipare la maternità di donne in carriera o di donne che sono affette da patologie di prematuro esaurimento della riserva ovarica. La tecnica di congelamento inoltre incontra il consenso dei vari comitati bioetici, in quanto l'ovocita pur avendo in se racchiuso un complesso programma di sviluppo che porta alla nascita di un nuovo individuo, non può attuarlo se non è fecondato. Società, scienza e religione quindi hanno manifestato il proprio consenso a riguardo della tecnica, ma, di fatto la criopreservazione ovocitaria riduce la competenza allo sviluppo. Pertanto è necessario monitorare quelli che sono i protocolli attualmente in uso nella clinica medica per individuare eventuali danni indotti dalle procedure di criopreservazione che potrebbero spiegare i ridotti successi della metodica. Le prime gravidanze ottenute a partire da ovociti congelati risalgono ormai a più di 20 anni fa (*Chen, 1986; Van Uem, 1987*), e da allora, nonostante siano stati messi a punto dei protocolli di congelamento più efficienti che hanno migliorato le percentuali di sopravvivenza allo scongelamento e quelle di fecondazione mediante ICSI (iniezione

intracitoplasmatica dello spermatozoo), i tassi di impianto restano insoddisfacenti (1-5%). Inoltre, circa un terzo degli impianti esita in interruzioni spontanee della gravidanza (Porcu 2001). Tutto ciò va in contrasto con le percentuali di successo ottenute con la criopreservazione di spermatozoi o di embrioni, e fa emergere quanto sia difficile riuscire a congelare una cellula così complessa quale l'ovocita. I primi protocolli di congelamento erano basati sulla cosiddetta procedura lenta a base di DMSO. Solo nel 1993, quando la sostituzione del DMSO con il propandiolo (Pr-OH) e il saccarosio, fece registrare una nuova gravidanza (Gook et al., 1993), l'interesse verso questa tecnica fu nuovamente acceso. Successivamente l'aumento della concentrazioni di saccarosio da 0,1 allo 0,3 M ha permesso di migliorare le rese di sopravvivenza post scongelamento, di fecondazione e di sviluppo (Fabbri et al., 2001). Tuttavia, gruppi diversi hanno riportato dati estremamente discordanti sull'outcome clinico del congelamento lento secondo Fabbri. Da un lato, si riportano percentuali di sopravvivenza che vanno dal 75 al 90%, con percentuali di fecondazione ottenute comprese tra il 67-83%; mentre quelle di gravidanza vanno dal 37 al 57% (Shee van chen et al, 2005; Xiao Hong li et al. 2005; Barrit et al. 2007). Dall'altro lato invece, le percentuali di sopravvivenza allo scongelamento vanno dallo 37% al 74%; le percentuali di fecondazione scendono (53-76%); mentre quelle di gravidanza sono circa 6 volte in meno (5-12%) rispetto a quanto precedentemente detto. Inoltre il valore percentuale di interruzioni di gravidanza è pari al 33-47% (Borini et al. 2006;

La Sala et al. 2006; Levi Setti 2006). C'è da considerare che gli studi clinici che hanno riportato dati estremamente favorevoli sono stati effettuati su un numero basso ed una classe selezionata di pazienti sia da un punto di vista di età che per totale assenza di fattori femminili visto che erano coinvolte in cicli di ovodonazione. Dall'altra parte, gli studi dei gruppi italiani post legge sono stati condotti su numeri elevati di pazienti con classe di età e fattori di infertilità che rientrano nella media della popolazione che si rivolge alla fecondazione assistita.

Molti studi hanno dimostrato che la competenza allo sviluppo, viene acquisita durante il processo di maturazione citoplasmatica, una serie di rimodellamenti strutturali e molecolari nel citoplasma dell'ovocita che si svolge durante la maturazione meiotica. Variazioni dell'assetto cellulare e molecolare raggiunte durante la maturazione possono influenzare negativamente tale acquisizione di competenza (*Watson et al., 2002*). Le forze osmotiche generate durante i cicli di disidratazione-reidratazione, la tossicità dei crioprotettivi, possono in qualche modo disturbare la funzionalità di diversi organuli; la struttura del fuso mitotico e della cromatina dell'ovocita in metafase II, fattori questi che incidono sulle percentuali di sopravvivenza allo scongelamento. Il fuso meiotico e la frammentazione del DNA sono stati considerati fra le prime possibili cause di ridotte competenze allo sviluppo. Infatti, studi condotti su ovociti di topo avevano rilevato una depolimerizzazione del fuso meiotico allo

scongelo (*Pickering and Johnson, 1987*). Tuttavia, dopo numerosi lavori che hanno confermato che anche in ovociti umani la criopreservazione induce una depolimerizzazione del fuso, attualmente si è concordi sul fatto che la depolimerizzazione del fuso meiotico è transitoria e reversibile e la sua normale struttura viene riacquisita dopo 2 - 3 ore di coltura (*Rienzi et al., 2004; Bianchi et al., 2005*). Inoltre, studi nel topo su embrioni generati da ovociti criopreservati non hanno rilevato percentuali di aneuploidie maggiori di quelle presenti in embrioni generati da ovociti freschi (*Gook et al., 1993*).

Cobo et al. (2001) usando sonde per i cromosomi 13, 18, 21, X e Y, hanno mostrato simili tassi di aneuploidia sia in embrioni sviluppati dalla fecondazione di ovociti congelati con metodo lento a base di 1.5 mol/l PrOH e 0.2 mol/l saccarosio sia in embrioni generati a partire da ovociti freschi (*Cobo et al., 2001*). Stachecki et al. (2004), hanno riportato che sia ovociti freschi che ovociti criopreservati mantengono intatti la morfologia del fuso e l'assetto cromosomico (76.7 e 76.7% versus 69.7 e 71.2%, in ovociti freschi e criopreservati rispettivamente). Nello specifico si è visto che i danni a carico del fuso sono reversibili e che vengono recuperati dopo un paio d'ore di coltura in vitro post-scongelo; infatti aumentando la concentrazione di saccarosio da 0,1 M a 0,3 M, gli ovociti che presentavano un fuso normale erano il 70%, percentuale assolutamente comparabile a quella invece riscontrata negli ovociti freschi (73%). Pertanto sulla base di

quanto detto sono da escludere le alterazioni della morfologia del fuso tra le possibili concause della bassa competenza allo sviluppo embrionale degli ovociti criopreservati. Negli ultimi anni si va affermando come tecnica alternativa, veloce e meno dannosa del congelamento lento, la vitrificazione. Essa è stata introdotta per la prima volta nel 1985 su ovociti di topo (*Rall et al., 1985*) e da allora nuovi protocolli sono stati messi a punto per vitrificare gameti, zigoti embrioni di varie specie di mammiferi, uomo compreso. Nel 1999 il gruppo di Chen diede notizia che 7 ovociti MII vitrificati sopravvivevano tutti allo scongelamento, mentre 6 venivano fecondati, clivati e trasferiti (*Chen et al.; ASRM 1999*). Successivamente, è stato riportato che su un totale di 474 ovociti vitrificati il 68,6% sopravviveva e di questo il 41,7% veniva iniettato (*Yoon et al 2003*). Tuttavia, almeno fino a pochi anni fa, le gravidanze descritte (*Kuwayama et al 2005; Lucena et al. 2006*) erano limitate, complessivamente poco più di trenta. I valori relativi alla vitrificazione hanno fatto registrare negli anni non pochi risultati controversi a seconda dei crioprotettivi e dei supporti utilizzati. La prima nascita da ovociti umani vitrificati (*Kuleshova et al., 1999*) prevedeva un protocollo a base di EG 5.5M e saccarosio 1.0 M ed il supporto usato era la “thin straw”. Con la sostituzione della thin straw con i retini per microscopia elettronica (*Wu et al., 2001; Yoon et al., 2003*) si sono registrate percentuali di sopravvivenza e fecondazione dopo ICSI, rispettivamente pari a 69 e 72%, anche se le percentuali di gravidanza rimanevano al di sotto del 10%. Riducendo l’EG a

5M ed utilizzando come supporto di vitrificazione le cryotip le percentuali di sopravvivenza e fecondazione sono salite al 90 %, mentre quelle di gravidanza salgono al 18,5% (*Kuwayama et al., 2005*). Aggiungendo all'EG anche il DMSO rispettivamente nelle concentrazioni di 2.7M e 2.1M , i tassi di sopravvivenza hanno continuato ad aumentare mentre quelli di impianto e nati a termine restano ancora altalenanti (*Katayama et al., 2003; Kyono et al., 2005; Lucena et al., 2006; Selman et al., 2006; Antinori et al., 2006*). E' stato ampiamente dimostrato che la vitrificazione sia meno dannosa per il fuso meiotico rispetto al protocollo di congelamento lento (*Gardner et al., 2007*) infatti dopo 3 ore di incubazione post scongelamento, esso verrebbe di nuovo assemblato (*Cobo et al., 2008*). Studi condotti nel bovino hanno dimostrato che il protocollo di vitrificazione che utilizza sia le OPS che i Cryotops, riduce i danni al fuso incidendo positivamente sull'assetto cromosomico (*Morato et al., 2008*). Escludendo quindi anche per la vitrificazione possibili danni a carico del fuso e dell'assetto cromosomico, gli studi per giustificare una bassa competenza allo sviluppo embrionale pre e post impianto sono stati rivolti altrove.

Tra i possibili target di danni in letteratura viene riportato: la riduzione dei granuli corticali (GC) nell'uomo e nel topo (*Al-Hasani and Diedrich, 1995*); l'indurimento della zona pellucida che determina l'impossibilità di penetrazione spermatica nel topo (*Matson et al., 1997*), dovuta probabilmente ad una esocitosi prematura dei GC innescata da uno dei crioprotettivi

utilizzati ovvero il DMSO (*Vincent et al., 1990*). Anche i dati riguardanti l'esocitosi dei granuli restano tutt'ora discordanti. Infatti sebbene alcuni lavori su uomo e topo non abbiano fatto registrare variazioni nel numero dei granuli corticali (*Van Blerkom et al., 1994; Jones et al., 2004; Li et al., 2005*), protocolli di congelamento lento che differivano per diverse concentrazioni di saccarosio hanno fatto registrare notevoli variazioni del loro numero (*Ghetler et al., 2006; Nottola et al., 2007*). Nel presente lavoro di tesi, le osservazioni ultrastrutturali con analisi morfometrica su ovociti freschi di controllo ed ovociti trattati con congelamento lento secondo Fabbri, hanno dimostrato che tale metodica comporta una significativa riduzione dei granuli corticali (*Gualtieri et al., 2008*). Infatti, negli ovociti 0,3 M saccarosio la riduzione osservata è di circa 3 volte rispetto al controllo ($3,35/10 \mu\text{m} \pm 1,94$ vs $10,30/10 \mu\text{m} \pm 3,9$; $P < 0,001$). La diminuzione del numero dei GC è dovuta ad una loro esocitosi, come rilevato nella analisi ultrastrutturale, e potrebbe essere strettamente correlata ad un rilascio prematuro di calcio, dovuto ai criopreservanti e/o alle basse temperature. L'esocitosi dei granuli è uno dei primi eventi innescato dai transienti di calcio alla fecondazione. Lo spermatozoo innesca l'idrolisi del fosfatidilinositolo presente a livello dell'oolemma, con conseguente rilascio intracellulare di inositolo trifosfato (IP₃). L'IP₃ è in grado di indurre un rilascio di ioni calcio (Ca⁺⁺), che a sua volta innesca l'esocitosi dei GC. E' però da sottolineare che i transienti di calcio esercitano una serie di altri importanti

eventi nell'attivazione dello sviluppo che vanno ben oltre l'esocitosi dei GC. Tali elevazioni di calcio, agiscono come secondi messaggeri in una serie di pathways che rientrano nell'attivazione ovocitaria e nello sviluppo embrionale, regolando la progressione del ciclo cellulare. (*Malcuit et al., 2006; Whitaker et al., 2006*). Infatti si assiste ad una ripresa della meiosi dalla metafase II, ad una progressione del ciclo cellulare e ad un reclutamento degli mRNA materni capaci a questo punto di essere tradotti in proteine (*Kline and Kline 1992; Shwan and Ozil, 1994; Dulcibella et al., 2002*). E' interessante notare che alterazioni sperimentali della corretta successione delle oscillazioni di calcio alla fecondazione sono in grado di esercitare effetti a lungo termine alterando il corretto sviluppo pre e post-impianto nel modello murino (*Ozil and Huneau, 2001*). Quindi una riduzione nella densità dei granuli corticali potrebbe essere spiegata con un rilascio prematuro di calcio, il quale andrebbe ad attivare sempre prematuramente tutta una serie di eventi che di norma si osservano alla fecondazione, spiegando così le ripercussioni negative che si hanno in termini di competenza allo sviluppo embrionale. Ad avvalorare la nostra tesi vi è il lavoro di Jones che riporta una ridotta capacità da parte di ovociti umani congelati, di rispondere allo ionoforo A23187 (*Jones et al., 2004*). Infatti in ovociti congelati con protocollo lento a base di Pr-Oh 1.5M e saccarosio 0,2M, la capacità di risposta all'attivatore si riduceva di circa otto volte. In realtà ci sarebbe la possibilità che sia lo stesso crioprotettivo, il propandiolo, ad indurre un aumento di

calcio. Nel topo infatti, tale crioprotettivo veicola passivamente lo ione dal mezzo esterno; difatti la rimozione del calcio dalle soluzioni di congelamento riduce l'aumento di calcio intracellulare (*Larman et al., 2007*). Anche L'EG ed il DMSO inducono un aumento dei livelli di calcio, tanto da indurre l'hardening della zona pellucida (*Larman et al., 2006*), ma questo avviene in modo differente a seconda del crioprotettivo. Infatti gli effetti registrati in presenza di DMSO sono per lo più comparabili sia in presenza che in assenza di calcio dal mezzo esterno, mentre per l'EG le oscillazioni da calcio diminuiscono sottraendo il calcio dalle soluzioni di congelamento. Ciò significa che il DMSO agisce solo e direttamente sui siti interni di immagazzinamento di calcio come il reticolo endoplasmatico; l'EG invece veicola in modo passivo il calcio dall'esterno (*Larman et al., 2006 Gardner et al., 2007*). Dall'analisi della struttura dei mitocondri negli ovociti congelati secondo Fabbri è emerso che circa il 71% degli ovociti 0,3M saccarosio presenta mitocondri danneggiati, con doppia elettrondensità e con rotture nella doppia membrana con conseguente svuotamento della matrice mitocondriale. Inoltre le analisi in fluorescenza del potenziale della membrana mitocondriale interna con sonda JC1 qui condotte hanno evidenziato che tali alterazioni strutturali sono accompagnate da perdita del potenziale dei mitocondri distribuiti nel citoplasma pericorticale dell'ovocita con conseguente diminuzione nella produzione di ATP. L'attività dei mitocondri

pericorticali dell'ovocita di mammifero alla fecondazione ha importanti conseguenze sulla potenzialità di sviluppo.

Inoltre, dati nel topo evidenziano che la funzionalità dei mitocondri pericorticali è altresì necessaria per il corretto svolgimento dei transienti di calcio alla fecondazione. Infatti Dumollard ha evidenziato che il calcio rilasciato dal reticolo endoplasmatico al momento della fecondazione va direttamente a regolare la produzione di ATP nei mitocondri, stimolando l'attività degli enzimi del ciclo di Krebs, la catena di trasporto degli elettroni e l'attività dell'ATP sintetasi (*Dumollard et al., 2004*). Sarà lo stesso ATP a mantenere i livelli basali di calcio nell'ovocita non fecondato e a ripristinare i valori fisiologici dopo i vari transienti che si hanno alla fecondazione. In letteratura è presente un unico studio effettuato su un numero estremamente limitato di ovociti umani congelati con un protocollo lento che è stato dismesso nella clinica che dimostra che gli ovociti congelati/scongelati presentavano mitocondri pericorticali disfunzionali (*Jones et al. 2004*), confermando quanto è stato osservato nella presente tesi che però ha utilizzato un numero rilevante di ovociti congelati con un protocollo tuttora in uso nella riproduzione assistita umana.

Di fatto, sulla base dei dati qui esposti, è possibile ipotizzare che la criopreservazione lenta secondo Fabbri induce un aumento prematuro di ioni calcio che porta ad esocitosi dei granuli corticali e che non sappiamo se possa inoltre innescare in modo

premature alcuni dei successivi eventi che fisiologicamente si svolgono alla fecondazione. Alla luce della letteratura sul topo (*Larman et al., 2007*), l'incremento di calcio potrebbe essere dovuto a veicolazione passiva di calcio dall'esterno da parte del PROH. I nostri esperimenti in time lapse sulle elevazioni di calcio intracellulare in ovociti umani esposti ai livelli di PROH ed ai tempi ai quali viene condotta normalmente la criopreservazione lenta, dimostrano per la prima volta che anche nella nostra specie il PROH innesca aumenti di calcio. Inoltre, poiché le elevazioni di calcio sono significativamente maggiori in presenza di calcio esterno ma vengono registrate anche in sua assenza, i dati esposti nella presente tesi dimostrano che il PROH è in grado di innescare elevazioni di calcio nell'ovocita umano sia per veicolazione dal mezzo esterno che per rilascio da siti di immagazzinamento intracellulari. Tali risultati, uniti ai danni funzionali e strutturali a livello dei mitocondri pericorticali rilevati in circa i 2/3 degli ovociti congelati in modo lento portano a suggerire che i transienti di calcio innescati alla fecondazione degli ovociti congelati con tale metodica possano svolgersi in modo alterato. E' significativo che nel topo la sovra espressione e sotto espressione sperimentale dei transienti di calcio in ovociti fecondati in vivo hanno effetti differenziali, riducendo considerevolmente la potenzialità di impianto e aumentando quella delle interruzioni di gravidanza (*Ozil et al 2006*). In pratica gli stessi effetti che si osservano nell'outcome clinico dei cicli di fecondazione

effettuati con ovociti criopreservati con metodica Fabbri (*Borini et al. 2006; La Sala et al. 2006; Levi Setti 2006*).

Altra dati ultrastrutturali morfometrici presi in considerazione nel presente studio in ovociti freschi e congelati con metodica Fabbri sono stati: 1) l'area delle vescicole di reticolo endoplasmatico liscio (SER); 2) la distribuzione di organuli quali il SER e i mitocondri in una fascia pericorticale dell'ovocita di 10 micron di spessore; 3) la presenza di vacuoli. I dati emersi sono stati altresì interessanti. Infatti, il congelamento lento induce rigonfiamento delle vescicole di SER (area media SER ovociti congelati vs ovociti controllo: $0.109 \mu\text{m}^2 \pm 0.054$ vs $0.040 \mu\text{m}^2 \pm 0.02$, $P < 0,01$). Anche in questo caso le alterazioni del SER, sito di immagazzinamento e rilascio di ioni calcio, potrebbero riflettersi in alterazioni dei transienti alla fecondazione. Per quanto concerne la distribuzione pericorticale dei mitocondri e delle vescicole di SER, si è osservato nei campioni 0,3M saccarosio nel 52% dei casi una fascia pericorticale di circa 10 micron totalmente sprovvista di organuli, carattere non osservato negli ovociti controllo. Il "clearing" del citoplasma pericorticale può indicare che tale metodica di criopreservazione altera i rapporti tra il citoscheletro e gli organuli inducendo una dislocazione di questi ultimi verso il citoplasma più profondo. La presenza di vacuoli all'osservazione a fresco viene considerata un indice di bassa qualità ovocitaria nella riproduzione assistita umana. , Nel presente studio, la presenza di zone vacuolate ha un incidenza significativamente maggiore negli ovociti congelati

secondo Fabbri rispetto a quelli controllo (64% vs 12,5%, $P < 0,01$).

In ultimo, per quanto riguarda le osservazioni qui condotte sugli ovociti congelati con metodica lenta, non è stata rilevata né la presenza di caspasi attivate, né quella di frammentazione di DNA, dato che quindi indica che la criopreservazione ovocitaria nella nostra specie, differentemente da quanto osservato in altri mammiferi, non induce un processo apoptotico.

Come esposto sopra, la vitrificazione e le sue recenti modifiche sembrano costituire una metodica clinica di maggior successo nella criopreservazione ovocitaria umana. Tuttavia, tale metodica richiede una elevata manualità e lievi differenze nelle modalità e tempi di esposizione ai crioprotettivi, così come nei supporti utilizzati per il congelamento possono risultare in un outcome clinico molto differente. Per quanto riguarda osservazioni di ricerca di base condotte con tale metodo, studi sul proteoma di ovociti MII di topo freschi, criopreservati in modo lento o vitrificati hanno dimostrato un alterazione del profilo proteico in ovociti congelati con protocollo lento, mentre il protocollo di vitrificazione dava un profilo proteico molto simile a quello riscontrato in ovociti freschi (*Gardner et al., 2007; Larman et al., 2007*). Valori di espressione proteica più simili ai freschi si sono ottenuti anche in ovociti congelati in modo lento in assenza di calcio esterno. Nel complesso tali dati indicano che la criopreservazione può indurre la down-regulation di alcune proteine, presumibilmente dovuta ad una

loro degradazione, così come una up-regulation che potrebbe essere dovuta ad un reclutamento prematuro di mRNA. La particolare metodica di criopreservazione utilizzata, e la presenza/assenza di calcio esterno influenzerebbero tali alterazioni.

Nel complesso i dati esposti in questa tesi, complementati con i dati della letteratura indicano che i maggiori responsabili del ridotto sviluppo embrionale pre e post impianto di ovociti congelati con metodo lento potrebbero essere una prematura ondata di calcio, indotta dai crioprotettivi e dalle basse temperature unita ad una alterata modulazione dei transienti di calcio alla fecondazione dovuta a disfunzionalità dei mitocondri pericorticali. A tal proposito, in letteratura è presente un unico studio effettuato su un numero estremamente limitato di ovociti umani congelati con un protocollo lento che è stato dismesso nella clinica che dimostra che gli ovociti congelati/scongelati non riescono a rispondere allo ionoforo A23187 con aumenti dei livelli di calcio (*Jones et al. 2004*).

Nella presente tesi, sono state studiate le escursioni dei livelli di calcio intracellulare indotte da ionoforo A23187 in ovociti freschi, criopreservati secondo Fabbri e vitrificati. Le escursioni massime dei livelli di calcio nei tre gruppi di ovociti non erano significativamente diverse. Tuttavia, resta la possibilità che i transienti di calcio alla fecondazione negli ovociti criopreservati possano essere sostanzialmente alterate rispetto a quanto avviene in ovociti freschi; possibilità che non può essere testata

nella nostra specie sia per ragioni etiche sia in base alla legge che regola la PMA nel nostro paese.

Come sopra esposto, i risultati sul congelamento lento lasciano ipotizzare che il PROH e/o il freddo causino un incremento intracellulare di calcio. Non esistono studi a tal proposito nella nostra specie mentre sono disponibili dati recenti su ovociti murini. Conseguentemente, è stata qui studiata la capacità dei crioprotettivi utilizzati nel congelamento lento e nella vitrificazione, singolarmente o in modo combinato, ed in presenza/assenza di calcio esterno, di elevare il calcio ionico intracellulare. Gli aumenti più elevati del calcio intracellulare sono stati registrati con il PROH in presenza di calcio esterno. Tuttavia, diversamente da quanto riportato per gli ovociti di topo (*Larman et al., 2007*), il PROH nella nostra specie è in grado sia di veicolare calcio dall'esterno che di scaricarlo da siti interni. Per quanto riguarda il DMSO, esso veicola soprattutto calcio dal mezzo esterno in quanto la risposta in assenza di calcio esterno risulta essere molto più modesta. Anche in tal caso, è evidente una differenza di specie nella risposta degli ovociti al DMSO. Nel topo infatti, esso mobilita soprattutto il calcio da siti di immagazzinamento intracellulari (*Larman et al., 2006*). Anche l'effetto dell'EG risulta essere differente tra topo ed uomo. Infatti, nel topo questo crioprotettivo veicola passivamente calcio dal mezzo esterno (*Larman et al., 2006*), mentre nel presente studio le curve di escursioni del calcio in risposta all'EG in presenza o assenza di calcio esterno risultano perfettamente sovrapponibili, il che dimostra che l'effetto

dell'EG sugli ovociti umani è quello di mobilitare il calcio dai siti di immagazzinamento intracellulari. Inoltre, se viene condotta l'intera sequenza di esposizione ai criopreservanti prevista dalla metodica di vitrificazione si osservano incrementi di calcio protratti ogni qualvolta viene incrementata la concentrazione di DMSO ed EG, e tali incrementi sono presenti anche nel caso in cui venga omissa il calcio esterno. Questi risultati rappresentano i primi dati presenti in letteratura sugli effetti di criopreservanti sui livelli di calcio in ovociti umani e costituiscono una importante conoscenza di base per l'allestimento e la rifinitura di metodiche di criopreservazione ovocitaria.

Nel presente studio, ovociti umani sono stati vitrificati secondo un protocollo attualmente adottato in modo diffuso nella riproduzione assistita e che, nonostante ci siano risultati discordanti, mediamente producono un successo clinico significativamente maggiore di quanto osservato con la criopreservazione lenta. Le percentuali di sopravvivenza registrate sono leggermente superiori a quanto osservato con il congelamento lento (82% vitrificati vs 76% congelati lenti). Mentre i risultati delle analisi ultrastrutturali hanno fatto emergere profonde differenze in termini di densità del numero dei GC, della struttura mitocondriale, delle vescicole di reticolo endoplasmatico, dei vacuoli, dell'organizzazione e disposizione degli organelli. L'analisi morfometrica ha dimostrato che gli ovociti vitrificati riducevano allo scongelamento il numero di granuli corticali di circa la metà rispetto ai campioni freschi

(4,89/ 10 μm $\pm 2,34$ contro 10,30/10 μm $\pm 3,9$; $P < 0,001$), mentre negli ovociti 0,3 M saccarosio la riduzione osservata era di circa 3 volte rispetto al controllo (3,35/10 μm $\pm 1,94$; $P < 0,001$). Dall'analisi della ultrastruttura dei mitocondri è emerso che solo il 15% degli ovociti vitrificati presenta alterazioni strutturali dei mitocondri contro il 71% rilevato nei congelati lenti. Il SER appare meno rigonfiato rispetto a quanto osservato nei congelati lenti (0.084 $\mu\text{m}^2 \pm 0.03$ vs 0.109 $\mu\text{m}^2 \pm 0.054$; $P < 0,01$). Per quanto concerne il "clearing" di organuli dal citoplasma pericorticale è stata osservata una marcata riduzione di tale alterazione in ovociti vitrificati rispetto ai congelati lenti (10% vs 52%). E lo stesso per quanto riguarda la vacuolazione (64% nei congelati lenti vs 33% nei vitrificati). Da quanto esposto si evince che entrambi i protocolli esaminati sono comparabili da un punto di vista di sopravvivenza, mentre il protocollo di vitrificazione sicuramente induce minore esocitosi dei granuli corticali, degenerazione mitocondriale, danno osmotico al SER, spostamenti di organuli verso il citoplasma profondo e vacuolazione.

In conclusione, questo studio ha identificato specifici difetti ed alterazioni innescate dalla criopreservazione in ovociti umani che sono state messe in relazione alla ridotta capacità di impianto e gravidanza a termine riportate nella riproduzione assistita umana. I "markers" di danno identificati sono stati utili per valutare gli effetti della metodica di vitrificazione, metodica che sta avendo maggior successo nella clinica e che è risultata indurre alterazioni drasticamente minori rispetto a

quanto riscontrato con congelamento lento. Questi dati, assieme ai risultati sugli effetti singoli o combinati dei criopreservanti sui livelli di calcio ionico ovocitario costituiscono una importante base di partenza per la valutazione e l'allestimento delle metodiche di criopreservazione nelle biotecnologie della riproduzione assistita.

“TESSUTO OVARICO”

**DISCUSSIONE E
CONCLUSIONI**

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Negli ultimi anni, le nuove strategie antitumorali hanno portato ad un progressivo aumento della sopravvivenza media sia in pazienti pre-puberi che in età riproduttiva affette da neoplasie quali linfomi, leucemie, sarcomi e tumori solidi, ponendo l'attenzione sugli effetti a lungo termine delle terapie oncosoppressive e sulla qualità di vita delle pazienti dopo la remissione dalla neoplasia. A tal proposito, le alterazioni della funzionalità follicologenetica e steroidoogenetica rappresentano indubbiamente le problematiche più discusse. Diversi studi hanno, infatti, dimostrato che i trattamenti (chemioterapia e radioterapia) impiegati per combattere le neoplasie inducono un danno progressivo ed irreversibile nelle ovaie, rappresentato da un decremento nel numero di follicoli associato con l'insorgenza di fibrosi (*Sobrinho et al, 1971*). In particolare, in una percentuale rilevante di pazienti si manifesta amenorrea transitoria o persistente e, nel lungo periodo, menopausa precoce. Dunque, da diversi anni, in letteratura si dibatte per la scelta di una strategia sperimentalmente valida per preservare o restituire la fertilità nelle pazienti oncologiche. Attualmente le metodiche teoriche applicabili sono diverse: crioconservazione di embrioni, crioconservazione di ovociti, crioconservazione del tessuto ovarico (*Donnez et al., 2005; Meiorow et al., 2005; Kim, 2006*). Tuttavia, valutati i limiti etici e pratici, la crioconservazione del tessuto ovarico si propone come tecnica effettivamente applicabile. Numerosi sono, infatti, i vantaggi in relazione alle altre procedure di crioconservazione. In primo luogo, essa consente di preservare in situ centinaia di follicoli primordiali contenenti ovociti immaturi, che risultano molto resistenti ai processi di

congelamento e scongelamento (*Rutheford and Gosden, 1999*). In secondo luogo, è una tecnica di rapida esecuzione e poco invasiva: le biopsie di corticale ovarica possono essere recuperate da pazienti, in ogni stadio del ciclo mestruale, mediante laparoscopia. In ultimo, ma non in ordine di importanza, è la sola metodica applicabile nel caso di pazienti in età pediatrica e nelle pazienti in cui posticipare l'inizio della terapia oncologica per sottoporsi a stimolazione ormonale e prelievo chirurgico degli ovociti (per congelare questi oppure gli embrioni derivanti da essi, se la paziente ha già un partner), costituirebbe un rischio inaccettabile.

Studi precedenti hanno mostrato la possibilità di effettuare la crioconservazione del tessuto ovarico. I primi dati risalgono agli anni 1950-60, quando frammenti di ovaio murino sono stati congelati a -79°C in una soluzione contenente glicerolo (*Parkes and Smith, 1953; Deanesly, 1957; Parkes, 1957*). Già nel 1960 si è ottenuta la prima gravidanza da tessuto ovarico crioconservato nel topo (*Parrot, 1960*), ma soltanto negli ultimi quindici anni sono stati messi a punto protocolli di congelamento e scongelamento innovativi che hanno consentito di ottenere risultati incoraggianti nel modello animale e di aprire la sperimentazione al modello umano. Nel 1996, infatti, Hovatta ha riportato che biopsie ovariche umane crioconservate in dimetilsolfossido presentano, allo scongelamento, dei follicoli morfologicamente normali (*Hovatta et al 1996*). Inoltre, colture di 4-21 giorni delle "strip" scongelate evidenziavano una elevata sopravvivenza e capacità di accrescimento dei follicoli (Hovatta et al, 1997).

TESSUTO OVARICO: discussione e conclusioni

In questo contesto, si inserisce lo studio effettuato nel presente lavoro di tesi che si è proposto di identificare un adeguato protocollo di crioconservazione del tessuto ovarico umano.

Studi precedenti suggeriscono l'esistenza di due possibili tecniche di crioconservazione: congelamento lento e vitrificazione. Le principali differenze tra le due metodiche riguardano la pratica di raffreddamento e la concentrazione di crioprotettivi utilizzata per prevenire la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno delle cellule. Il congelamento lento è una pratica interamente computerizzata, in cui il tessuto è esposto a concentrazioni moderate (1-2M) di crioprotettori e congelato lentamente secondo una curva programmata, con lo scopo di creare un gradiente di concentrazione tale da consentire una lenta fuoriuscita d'acqua dalla cellula accompagnata da un altrettanto lento ingresso di crioprotettore. La vitrificazione, invece, è una pratica interamente manuale, che prevede il trattamento preventivo del tessuto con soluzioni ad elevata concentrazione di crioprotettori (6M) e poi un abbassamento ultrarapido della temperatura per immersione diretta in azoto liquido. Ciò determina un passaggio delle soluzioni ad uno stato solido, come vitreo (*Fahy, 1986*), con il vantaggio di evitare la formazione di ghiaccio nella cellula e l'instaurarsi di squilibri osmotici e ionici determinati dalla formazione di ghiaccio extracellulare (*Rall, 1987*). In bibliografia sono riportati evidenti successi del congelamento lento (*Donnez et al, 2004; Oktay et al, 2004*) di tessuto ovarico rispetto alla vitrificazione dello stesso. Ciononostante, i risultati ottenuti nel presente lavoro dimostrano che le metodiche di congelamento delle strip ovariche, vitrificazione e congelamento lento, applicate seguendo un protocollo classico riportato in letteratura, non

evidenziano sostanziali differenze. Di fatto, sottoponendo strip di tessuto ovarico umano a congelamento lento con 1.5 mol/L DMSO + 0.1 mol/L saccarosio o a vitrificazione con 2.0 mol/L DMSO + 2.0 mol/L PROH + 0.2 mol/L saccarosio (*Li Yu-Bin et al, 2007*), si osserva, in entrambi i casi, la preservazione di un numero esiguo di follicoli di stadio primordiale o primario. Inoltre, tra i follicoli evidenziati, quelli normomorfi, di forma sferica e strutture cellulari ben preservate, sono il 44.5% per il congelamento lento e 55.6% per la vitrificazione, contro il 93.3% del campione di controllo. Dunque, vista la limitata efficienza delle procedure applicate, si è pensato di modificare opportunamente il protocollo testato. Poiché, uno dei principali danni da congelamento è rappresentato dalla destabilizzazione delle membrane indotta da un incremento della concentrazione intracellulare di elettroliti (*Lovelock, 1954*), in particolare il sodio, si è proceduto alla sostituzione del sodio con la colina nel mezzo base che funge da solvente per i crioprotettivi. Il sodio è uno dei principali componenti dei mezzi utilizzati per la crioconservazione e dunque contribuisce significativamente agli effetti delle soluzioni sulle cellule durante i processi di congelamento/scongelo. In condizioni fisiologiche, diffonde liberamente nella cellula e l'eccesso è rimosso da specifiche pompe (*Wolfe, 1993*). Durante il congelamento, invece, l'aumento della concentrazione di soluti extracellulari ne determina una diffusione nella cellula e al contempo il suo accumulo nel citoplasma, per una progressiva inattivazione delle pompe del sodio determinata dal decremento della temperatura. Le elevate concentrazioni così sviluppate sembrano essere incompatibili con la normale funzione cellulare.

Diversamente dal sodio, lo ione colina non attraversa la membrana cellulare e dunque, non contribuisce al carico cationico intracellulare.

I risultati ottenuti dalla crioconservazione con la colina evidenziano un'efficienza maggiore del congelamento lento rispetto alla vitrificazione. Di fatto, da confronto diretto con il tessuto a fresco del campione di controllo non si osservano differenze significative, sia in termini di densità follicolare (45 follicoli controllo, 65 follicoli congelamento lento e 13 follicoli vitrificato) sia in termini di percentuale di follicoli normomorfi di grado 1 (93.3% controllo, 84.6% congelamento lento colina, 69.2% vitrificazione con colina) e si evince una similitudine nella compattezza dello stroma. Se paragonati ai risultati precedentemente ottenuti con il protocollo Li Yu-Bin, sia per la vitrificazione che per il congelamento lento, si evince a tutti i livelli una migliore preservazione nei campioni trattati con colina, a conferma di un ruolo positivo di quest'ultima nella limitazione del danno da congelamento. Infatti, le analisi statistiche evidenziano un numero maggiore di follicoli e fra questi un numero limitato di follicoli in via di degenerazione (7.7% congelamento lento colina vs 44.4% congelamento lento Li Yu-Bin; 15.4% vitrificazione colina vs 22.2% vitrificazione Li Yu-Bin). L'osservazione al microscopio ottico mostra follicoli con una vescicola germinativa di forma sferica e dai contorni regolari, con cromatina condensata e facilmente identificabile, e cellule follicolari che rivestono in maniera uniforme l'ovocita. Mentre l'analisi al microscopio elettronico a trasmissione, mette in rilievo mitocondri di forma regolare e strutture lipidiche ben conservate, in particolare sono visibili lamelle anulate, e l'assenza di ampi spazi intercellulari tra cellule

follicolari, evidenziabili nei campioni trattati secondo protocollo tradizionale. Tuttavia è ancora necessario lavorare per risolvere quei problemi che attualmente non hanno trovato una risposta definitiva, ossia quale sia la migliore strategia per impiegare i frammenti ovarici dopo lo scongelamento e come ottenere da essi delle gravidanze senza rischiare di reintrodurre nella paziente anche cellule tumorali dalle quali era guarita. Negli ultimi anni è stata proposta una nuova strategia: l'isolamento dei follicoli dalla corticale ovarica (*Oktay et al, 1997*). Questa tecnica eliminerebbe il problema del reimpianto di metastasi poichè le cellule tumorali non possono superare la lamina basale (*Motta et al, 2003; Rodgers et al, 2003*). Studi passati suggeriscono l'esistenza di due possibili tecniche di isolamento dei follicoli: isolamento meccanico ed enzimatico. Tra le due l'isolamento enzimatico è sicuramente più semplice e veloce ma può determinare la degradazione della lamina basale e delle componenti follicolari. Pur non esistendo ancora un protocollo standardizzato, dalla letteratura si evince che l'enzima più utilizzato è la Collagenasi di tipo I prodotta da *Clostridium histolyticum*. (*Hovatta et al, 1999; Donnez et al, 2008*). Inoltre l'utilizzo della Dnasi I in combinazione con la collagenasi, come descritto anche in letteratura (*Demeestere et al 2002*), favorisce notevolmente la riuscita di questa tecnica. In questo contesto si inserisce lo studio effettuato nella presente tesi che, per motivi etici, si è proposto di identificare un adeguato protocollo di isolamento dei follicoli dalla corticale ovarica, utilizzando come modello animale il bovino, che presenta caratteristiche ovariche simili a quelle umane. In tutti i campioni osservati al TEM, sono stati riscontrati unicamente follicoli primordiali e primari.

TESSUTO OVARICO: discussione e conclusioni

In relazione ai parametri presi in considerazione, i follicoli presenti nel campione di controllo presentano un nucleo ben delineato con cromatina finemente dispersa, un ooplasma omogeneo ricco di mitocondri delimitato da un oolemma continuo e ben evidente. Le cellule follicolari, che formano uno strato uniforme e compatto, mostrano membrane cellulari ben evidenti e contatti intercellulari ben definiti, nuclei di notevole dimensione, caratterizzati dalla presenza di tipiche invaginazioni e addensamenti di eucromatina elettrondensa (Motta et al. 2003). La lamina basale è integra e in contatto con le cellule stromali circostanti.

Sono stati saggiati vari protocolli di isolamento enzimatico, che differivano per le modalità di taglio del cortex ovarico e del blocco della digestione enzimatica. I migliori risultati si sono ottenuti riducendo la cortex a frammenti di 0.5mm x 0.5 mm x 0.5 mm ed effettuando il blocco con FBS 100%.

In quest'ultimo caso, infatti, i follicoli di grado 1 rappresentano l'80% della popolazione totale, contro il 20% ed il 25% dei follicoli ottenuti rispettivamente con il blocco in dPBS più FBS 40%, seguito o meno da centrifuga. Inoltre, l'analisi di vitalità effettuata mediante Ioduro di propidio e Hoechst 33342 conferma i dati morfologici; infatti, la percentuale di vitalità è pari al 91%, nel caso in cui il blocco veniva effettuato con FBS 100%, contro il 32,5% ed il 40% negli altri due casi.

Una volta identificato un protocollo adatto per l'isolamento dei follicoli, si è pensato di procedere alla coltura degli stessi al fine di monitorare il loro accrescimento in vitro. Il terreno di coltura utilizzato era, MEM, supplementato con FCS 20%, 0.47mM acido piruvico, 1% Insulin-transferrin-selenium. A giorni alterni si effettuavano i cambi del mezzo di coltura e si controllavano la

morfologia e l'accrescimento. Si verifica un accrescimento medio del 44%, in quanto il diametro medio dei follicoli passa da $117,02\mu\text{m} \pm 45$ a $206,11\mu\text{m} \pm 69$ dopo circa 10 giorni di coltura. Resta, tuttavia da chiarire se tale incremento riguardi un aumento effettivo nel numero di cellule follicolari o un aumento di volume, dovuto ad una ritenzione di fluidi e se eventuali danni, causati dalla digestione enzimatica, possano essere effettivamente riparati dalla coltura.

Infine, si è cercato di mettere a punto un adeguato protocollo di vitrificazione dei follicoli, al fine di garantire un loro impiego in ambito clinico. Tale tecnica, infatti, permetterebbe di crioconservare i follicoli e di scongelarli al momento della remissione dalla patologia per poi reimpiantarli nell'ovaio della paziente. Questa metodica, mai effettuata su follicoli isolati, risulta particolarmente difficoltosa dal punto di vista tecnico a causa delle ridotte dimensioni e dalla complessità strutturale dei follicoli.

I follicoli isolati venivano, infatti vitrificati, direttamente in cryotip così come mostrato per gli ovociti umani. Allo scongelamento, i follicoli venivano analizzati morfologicamente e poi sottoposti al test di vitalità. Infatti, allo scongelamento, dopo 1h di incubazione in mezzo di coltura a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, i follicoli vitrificati in cryotip hanno il 48% di sopravvivenza.

La bassa percentuale di vitalità potrebbe essere spiegata dal fatto che i follicoli vitrificati subito dopo l'isolamento riporterebbero eventuali danni subiti in seguito alla digestione enzimatica. Pertanto, per verificare la validità della metodica di vitrificazione, i follicoli isolati venivano posti in coltura per 5 giorni prima di essere crioconservati.

Al termine della coltura, tutti i follicoli venivano vitrificati: di questi una parte veniva sottoposta immediatamente ad analisi di vitalità e la restante parte veniva posta in coltura per altri 5 giorni, per verificare la ripresa dell'accrescimento follicolare. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che i follicoli vitrificati post-coltura presentano una vitalità del 59% allo scongelamento. Questo dato evidenzia che il protocollo di crioconservazione adottato risulta idoneo per la vitrificazione dei follicoli. Inoltre, a conferma di ciò, i follicoli scongelati dopo ulteriori 5 giorni di coltura mostrano un accrescimento medio del 10%. La metodica rimane però piuttosto difficile da un punto di vista di esecuzione del protocollo, in quanto i follicoli hanno delle piccole dimensioni oltre al fatto che i follicoli vitali, tendono a piastrare durante la coltura. A tal proposito sono in corso studi preliminari sulla coltura e vitrificazione dei follicoli in matrici di alginato ed alginato/collagene che mostrano risultati promettenti.

In conclusione, i dati ottenuti mostrano che l'isolamento dei follicoli si propone come una metodica alternativa alla crioconservazione del tessuto ovarico. La sopravvivenza follicolare, affinando le tecniche, potrà in futuro risultare più elevata di quanto osservato in strips ovariche. L'isolamento follicolare, seguito da immissione dei follicoli in matrici biocompatibili e vitrificazione apre nuove prospettive nella preservazione della fertilità nelle pazienti oncologiche e nell'evitare che il ripristino delle funzioni riproduttive mediante trapianto possa reimmettere cellule tumorali nelle pazienti.

PERPLESSITA' E QUESTIONI ETICHE

Una questione di natura etica dibattuta in molti paesi ed in molte culture sia laiche che religiose, riguarda la criopreservazione di ovociti fecondati ed embrioni. Nel nostro paese dal 2004, dopo l'introduzione della legge 40, l'embrione risulta essere tutelato in modo assoluto, anzi forse in modo a volte contrastante con la tutela dei diritti alla salute della madre. Infatti, come già accennato, le metodiche di PMA prevedono una serie di trattamenti e interventi che per la donna risultano essere dannosi sia da un punto di vista fisico che psichico. Riuscire ad ottenere dopo stimolazione ormonale un elevato numero di ovociti e poterne utilizzare soltanto tre è:

-limitativo poiché si potranno ottenere al massimo tre embrioni ma spesso meno o addirittura nessuno in casi di fallimento della fecondazione;

-dannoso per la paziente perché: 1) nel caso in cui si ottengano tre embrioni su tre ovociti, la legge impone di trasferirli tutti in unico contemporaneo impianto, con maggiori rischi di gravidanze multiple; 2) nel caso di assenza di gravidanza la paziente dovrà risottoporsi a stimolazione e prelievo.

-dispendioso in quanto in caso di fallimento andrebbero riaffrontati i trattamenti con relativi costi.

La criopreservazione ovocitaria rappresenta quindi una valida alternativa esente da riserve etiche rispetto alla criopreservazione di zigoti o embrioni, e in contesti legislativi come quello attualmente presente nel nostro Paese, può riequilibrare lo sbilanciamento tra diritti del concepito e tutela dei diritti alla salute della madre che si è creato. L'interesse alla criopreservazione ovocitaria in ambito internazionale è elevato. Non solo per i problemi etico/legali associati agli embrioni

criopreservati ed al loro destino, ma anche in contesti dove sia permessa la ovodonazione o per preservare la fertilità di donne in carriera o a rischio di esaurimento precoce della riserva ovarica. Tuttavia, tale metodica è attualmente ancora non utilizzata in tutti i centri di riproduzione assistita e dove lo è presenta risultati discordanti. La fase di ricerca di base su modelli animali o anche nell'uomo sia per monitorare i danni delle diverse tecniche che la sicurezza di queste ultime è in continuo sviluppo. L'avanzare delle conoscenze di base in questo campo potrà contribuire allo sviluppo di nuove tecnologie di criopreservazione ovocitaria che possano avere un successo clinico ed una sicurezza equivalenti a quelle finora registrate per gli ovociti freschi.

Alcuni studi hanno dimostrato come diversi tipi di tumore, come ad esempio il linfoma, possano essere trasmessi anche al tessuto ovarico (*Shaw et al., 1996*) e che i rischi di contrarre linfoma al tessuto ovarico sia molto alto soprattutto in pazienti affetti da leucemia. La possibilità di trapiantare follicoli isolati costituisce senza dubbio una alternativa sicura rispetto al reimpianto di tessuto ovarico da un punto di vista di eventuale reimmissione di cellule tumorali. I dati sperimentali in questa tesi sono intesi a portare un contributo in questa direzione.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI:

Abir R, Fisch B, Nitke S, Okon E, Raz A and Ben Tafael Z (2001) "*Morphological study of fully and partially isolated human follicles*". Fertil Steril 75,141-146

AIRTUM Working group (2007) *I tumori in Italia rapporto 2006 – Incidenza, mortalità e stime*. Epidemiologia & Prevenzione; 30 (1) Supplemento 2.

Al-Hasani S, Diedrich K, Van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. "*Cryopreservation of human oocytes*". Human Reproduction 1987, **2**: 695-700.

Al-Hasani S, Diedrich K." Oocyte storage". In: Grudzinskas JG, Yovich JL, editors. Gametes-The Oocyte. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p. 376-95.

Almodin CG, Minguetti- Camara VC, Meister H, Ferreira J, Franco RL, Cavalcante AA, Radaelli MRM, Bahls AS, Moron AF and Murta CGV (2004) "*Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radioteraphy*". Hum Reprod 19,1287-1293

Aman RR, ParksJE. *Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes*. Biol. Repr 1994;50:103-83

Antinori M, Licata E, DaniG, Cerusico F, Vesaci C, Antinori S. *Cryotop vitrification of human oocytes results in high rate and healthy deliveries*. Rep Bio Online 2007; 14: 72-79

Arav A, Revel A, Nathan Y, Bor A, Gacitua H, Yavin S, Gavish Z, Uri M and Elami A (2005) *Oocyte recovery, embryo development and ovarian function after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary*. Hum Reprod, 20: 3554–3559.

Riferimenti bibliografici

Aubard J, Newton H, Piver P, Clavere P, Fermeau V, Gosden RG. “*The preservation of the follicular population and fertility in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue*”. In: 10th world congress of in vitro fertilization and assisted reproduction, Vancouver: Monduzzi Editore, 1997: pp. 99-103.

Baka SG, Toth TL, Veeck LL et al (1995) *Evaluation of the spindle apparatus of in-vitro matured human oocytes following cryopreservation*. Hum Reprod, 10: 1816-1820.

Bath LE, Wallace WH, Critchley HO. “*Late effects of the treatment of childhood cancer on the female reproductive system and the potential for fertility preservation*”. BJOG. 2002 Feb;109(2):107

Bianchi V, Coticchio G, Fava L, Flamigni C, Borini A. *A meiotic spindle imagin in human oocytes frozen with slow freezing procedure involving high sucrose concentration*. Hum Rep 2005 Apr 20(4):1078-83

Blatt J. “*Pregnancy outcome in long term survivors of childhood cancer*”. Med. Pediatric Oncol.33,29-33, 1999

Boiso I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, Barri PN and Veiga A (2002) *A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage*. Hum Reprod, 17: 1885–1891.

Boiso I, Marti M, Santalò J, Ponsà M, Barri PN, Veiga A. “*A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage*”. Human Reproduction 2002, **17**: 1885-91.

Boiso I, Veiga A, Edwards RG (2002) “*Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer*”. Repr Biomed Online5(3) 328-50

Boldt J, Cline D, McLaughlin D. “*Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles*”. Human Reproduction 2003, 18: 1250-5.

Borini A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C and Coticchio G (2006) "*Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration*". Hum Reprod, 21: 512–517.

Borini A, Bonu MA, Coticchio G, Bianchi V, Cattoli M, Flamigni C. "*Pregnancies and births after oocyte cryopreservation*". Fertility and Sterility 2004, 82: 601-5.

Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, Wininger JD, Massey JB, Lamb SV et al (2004) "*Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice*". Theriogenology, 61: 581–594.

Bosma GC, Davisson MT, Ruetsch NR et al (1989) "*A severe combined immunodeficiency (Scid) is on chromosome 16*". Immunogenetics, 29: 54-57.

Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Lailla JM and Balasch J (2001) "*Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue*". J Clin Endocrinol Metab, 86: 4489 – 4494.

Candy CJ, Wood MJ and Whittingham DG (2000) "*Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries*". Hum Reprod 15,1300-1304

Candy CJ, wood MJ, Whittingham DG (1994) "*Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries*".Hum Rep 15,1300-1304

Carrol J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfert E, Gosden RG. "*Extra-ovarian production of mature oocytes from frozen primary follicles*". J Reprod Fertil 1990; 90: 321-7.

Chen C, Chen S, Chang F, Wu G, Liu J and Yu C (2005) "*Autologous eterotopic transplantation of intact rabbit ovary after cryopreservation*". Hum Repr. 20 149-150

Chen C. (1986) "*Pregnancy after human oocyte cryopreservation*". Lancet. I(8486):884-6

Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, Remohì J. "*Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal*

status of embryos obtained from cryopreserved oocytes". Fertility and Sterility 2001, **75** (2): 354-60.

Cobo A, Perez S, De los Santos MJ, Domingo J, Remohi J. *Effect of different cryopreservation protocols on the metaphase II spindle in human oocytes*. Repr Biol Online 2008; 17(3):350-9

Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. (1996) "A morphological and functional study of the effect of slow freezing followed by complete in-vitro maturation of primary mouse ovarian follicles". Human Reprod 11 (12);2648-2655

Coticchio G, Bonu MA, Borini A, Flamigni C. "Oocyte cryopreservation: a biological perspective" European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology 2004, 115S: S2-S7.

Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A "What criteria for the definition of oocyte quality?"(2004) Acad Sci 1034:132-144

Coticchio G, De Santis L, Rossi G, Borini A, Albertini D, Scaravelli G, Alecci C, Bianchi V, Nottola S, Cecconi S. Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configuration after slow-cooling cryopreservation. Hum Rep 2006 vol 21, N7; pp1771-1776

Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. "Incidence of premature ovarian failure". Obstet. Gynecol 1986;67:604-606

Critchley HO (1999) *Factors of importance for implantation and problems after treatment for childhood cancer*. Med Pediatr Oncol, 33: 9 –14.

De Bruin JP, Bovenhuis H, van Noord PA, Pearson PL, van Arendonk JA, te Velde ER, Kuurman WW, Dorland M. "The role of genetic factors in age at natural menopause". Hum Reprod 2001;16:2014–2018.

Deanesly R." *Egg survival in immature rat ovaries grafted after freezing and thawing*". Proc Roy Soc Lond 1957; 147: 412-421.

Demeestere I, Simon P, Englert Y, Delbaere A (2003). *"Preliminary experience of ovarian tissue cryopreservation procedure: alternatives, perspectives, and feasibility"*. *Riprod Biomed Online* 7:572-579

Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonck A. et al. *"Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue"*. *Lancet*. 16;364(9443):1405-10, 2004 Oct

Ducibella T, Huneau D, Angelichio E, Xu Z, Schultz RM, Kopf GS, Fissore R, Madoux S, Ozil JP. *"Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca^{2+} oscillation number"*. *Dev Biol*. 2002 Oct 15;250(2):280-91.

Dumollard R, Marangos P, Fitzharris G, Swann K, Duchen M, Carroll J (2004) *"Sperm-triggered Ca^{++} oscillations and Ca^{++} homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production"*. *Development* 131,3057-3067

Epigg JJ, O'Brien MJ. *"Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicle"s*. *Biol reprod* 1996; 54: 197-207.

Ethics Committee of American Society for Reproductive Medicine: *Fertility preservation and reproduction in cancer patients*. *Fer Ster* 2005; 83; 1622-8

Fabbri R, Pasquinelli G, Bracone G, Orrico C, Paradisi R, Seraccioli R, Venturoli S. (2006) *"Fetal calf serum versus human serum: ultrastructural evaluation of protein support influence on human ovarian tissue cryopreservation"*. *Ultrastruc Pathol* 30(4); 253-260

Fabbri R, Pasquinelli G, Montanaro L, Mozzanega B, Magnani V, Tamburini F, Venturoli S, Keane D.(2007) *"Healthy early preantral follicle can be obtained in a culture of frozen-thawed human ovarian tissue of 32 weeks"*. *Ultrastruct pathol* 31(4);257-62

Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C (2001) *"Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival"*. *Hum Repr* 16,411-416

Riferimenti bibliografici

Fahy GM (1986) *Vitrification: a new approach to organ cryopreservation*. Meryman HT (ed.), *Transplantation: Approaches to Graft Rejection*. New York: Alan R. Liss, 1986: 305–335.

Fuller B. and Payntner S. (2004) “*Fundamentals of cryobiology in Reproductive Medicine*”. *Reprod. Biomed. Online* 9,680-691

Ghetler Y, Skutelsky E, ben nun I, Ben Dor L, Amihai D, Shalgi r (2006) “*Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules*”. *Fertil steril* 86,210-216

Godsen RG, Baird DT, Wadw JC and Webb R (1994) “*Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C*”. *Hum Reprod* 9,597-603

Gook D, Edgar D.H. and Stern C. (1999) “*Effect of cooling rate and dehydration regiment on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2 propanediol*”. *Human.Reprod.*14,2061-2068

Gook D, Schiewe MC, Osborn S, Asch RH, Jansen RPS, Johnston WIH.(1995) “*Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol*”. *Human Reproduction* 1995a, **10**: 2637-41.

Gook DA, Edgar DH, Borg J, Archer J and McBain JC (2005) *Diagnostic assessment of the developmental potential of human cryopreserved ovarian tissue from multiple patients using xenografting*. *Hum Reprod*, 20: 72– 78.

Gook DA, Edgar DH, Borg J. “*Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human ovarian tissue following xenografting*”. *Hum Reprod* 2003; 18: 1772-1781.

Gook DA, Osborn SM, Johnston WIH. “*Cryopreservation of mouse and human oocyte using 1,2 propanediol and the configuration of the meiotic spindle*”. *Human Reproduction* 1993, 8 (7): 1101-9

Gook DA, Osborn SM, Bourne H, Johnston WIH. “*Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal*

karyotypes and absence of stray chromosomes". Human Reproduction 1994, 9: 684-91.

Gook D, Schiewe MC, Osborn S, Asch RH, Jansen RPS, Johnston WIH. "*Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol*". Human Reproduction 1995a, 10: 2637-41.

Gosden RG (2005) "*Prospects for oocyte banking and in vitro maturation*". J Natl Cancer Inst Monogr. 34:60-63

Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. "*Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C*". Hum Reprod 1994; 9: 597-603.

Gosden RG. "*Restitution of fertility in sterilized mice by transferring primordial ovarian follicles*". Hum Reprod 1990; 5: 499-504. 17

Goswami D. and Conway GS. "*Premature ovarian failure*". Hum Rep Update 2005; 11:391-410

Gougeon A (1996) *Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses*. Endocrine Rev, 17: 121-155.

Greenlee RT., Hill-Harmon MB., Murray T., Thun M: "*Cancer statistic 2001*". Cancer J. Clin., 51,12-36, 2001.

Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R. "*Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status*". Fert. Steril 2008 (Epub ahead of print)

Hovatta O, Silye R, Abir R et al (1997) *Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture*. Hum Reprod, 12: 1032-1036.

Hovatta O, Silye R, Krausz T et al. "*Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants*". Hum Reprod 1996; 11:1268-1272.

Hovatta O, Wright c, Krausz T, Hardy K and Winston RML (1999) "*Human primordial and secondary ovarian follicles in*

long-term culture:effect of partial isolation". Human Reprod 14,2519-2524

Hreinsson JG, Ojala M, Fridstrom M, Borgstrom B, Rasmussen C, Lundqvist M, Tuuri T, Simberg N, Mikkola M, Dunkel L (2002) "*Follicles are found in the ovaries of adolescent girl with Turner's Syndrome*" J Clin Endocrinol Metab 87:3618-3623

Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, Stwhlik E. "*High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy*". Fertility and -Sterility 2003, 80: 223-4.

Kim SS (2006) "*Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions*". Fertil Steril, 85: 1–11.

Kim SS, Battaglia DE and Soules MR (2001) *The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond*. Fertil Steril, 75: 1049 –1056.

Kim SS, Soules MR and Battaglia DE (2002) *Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation*. Fertil Steril, 78: 77– 82.

Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. "*Birth following vitrification of a small number of human oocytes*". Human Reproduction 1999, 14: 3077-9.

Kurokawa T, Kinoshita T, Ito T, Saito H, Hotta T. *Detection of minimal residual disease in B cell lymphoma by a PCR-mediated RNase protection assay*. Leukemia 1996; 10: 1222-31.

Kuwayama, M, Vajta G, Kato O and Leibo SP. (2005) *Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes*. Reprod Biomed Online 11,300-308.

Jones A., Van Blerkom J, Davis P, Toledo AA." *Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence*". Human Reproduction 2004, 19: 1861-6.

Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM, Cha KY. “ *Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program*”. Fertility and Sterility 2003, 79: 1323-26.

Larman MG, Katz-Jaffe MG, Sheehan CB, Gardner DK (2007) *1,2-propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte physiology*. Hum Reprod 22,250-259

Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. *Calcium free vitrification cryoprotectant induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes*. Repr 2006; 131:53-61

Levi Setti PE, Albani E, Novara PV, Cesana A and Morreale G (2006) *Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles*. Hum Reprod, 21: 370–375.

Liu H, Wang CW, Grifo JA, Krey LC, Zhang J. *Reconstruction of mouse oocytes by germinal vesicle transfer: maturity of host oocyte cytoplasm determines meiosis*. Hum Reprod. 1999 Sep;14(9):2357-61.

Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R and Dhont M (2002) *Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries*. Hum Reprod, 17: 605–611.

Li XH, Chen SU, Zhang X, Tang M, Kui RY, Guo YL. *Cryopreserved oocytes of infertile couples undergoing assisted reproductive technology could be an important source of oocyte donation: a clinical report of successful pregnancies*. Hum Rep 2005 20(12):3390-4

Lovelock J (1954) *The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing*. Biochem J, 56: 265.

Lucena, E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A and Lucena A. (2006) *Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes*. Fertil Steril 85,108-111.

Malcuit C, Kurokawa M, Fissore RA. “ *Calcium oscillations and mammalian egg activation*”. J Cell Physiol. 2006 206(3):565-

73; Whitaker M. Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev.* 2006 86(1):25-88

Meirow D and Nugent D (2001) *The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction.* *Hum Reprod,* 7:535-543.

Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Fridman E, Zalel Y, Schiff E and Dor J (2005) *Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy.* *N Engl J Med* 353,318-321

Mitwally MF and Casper RF. *Aromatase inhibition reduces the dose of gonadotropin required for controlled ovarian hyperstimulation.* *J Soc Gynecol Invest,* 11: 406 –415

Morato R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. *Cryotops versus open pulled straws as carried for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on the spindle and chromosome configuration using different sucrose concentration.* *Cryob* 2008; 57 (2); 137-41

Moffa F, Comoglio F, Krey LC, Zhang Revelli A, Massobrio M. *Germinal vesicle transfer between fresh and cryopreserved immature mouse oocytes.* *Hum Reprod* 2002; 17:178-183.

Netwon H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V and Gosden RG (1996) *Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue.* *Human Repr* 11,1487-1491

Nottola SA, Macchiarelli G, Coticchio G, Bianchi S, Cecconi S, De Santis L, Scaravelli G, Flamigni C, Borini A. *Ultrastructure of human oocytes after slow cooling cryopreservation with ethylene glycol.* *Rep Bio Online* 2008 17(3)368-77

Nottola SA, Macchiarelli G, Coticchio G, Bianchi S, Cecconi S, De Santis L, Scaravelli G, Flamigni C, Borini A. *Ultrastructure of human oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentration.* *Hum Rep* 2007 22(4):1123-33
Epub 2006

Okatay K and Karlikaya G (2000) *Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue* *N Engl J Med* 342,1919

Oktaý K and Tilly J (2004). *Livebirth after cryopreserved ovarian tissue autotransplantation*. correspondence. Lancet 364,2091-2092

Oktaý K, Aydin B and Karlikaya G. *A technique for laparoscopic transplantation of frozen-banked ovarian tissue*. Fertil Steril 2001; 75: 1212-1216.

Oktaý K, Buyuk E, Libertella N, Akar M and Rosenwaks Z (2005) *Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation*. J Clin Oncol, 23: 4347-4353.

Oktaý K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu KP, Takeuchi T, Opsahl M and Rosenwaks Z (2004) *Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue* Lancet 363,837-840

Oktaý K, Buyurk E (2004) *Ovarian transplantation in humans: indications, techniques and the risk of reseeded cancer*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio5;113

Oktaý K, Economos K, Kan M et al. *Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm*. J Assoc Am Med Assoc 2001; 286: 1490-1493

Oktaý K, Newton H, Gosden RG. *Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice*. Fertil Steril. 2000 Mar; 73(3):599-603.

O'Neil L, Paynter SJ, Fuller BJ.(1997) *Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution*. Cryobiology 34(3);295-301

Ozil JP and Huneau D (2001) *Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca⁺⁺ signal regime on development*. Development 128,917-928

Paris MC, Snow M, Cox SL and Shaw JM (2004) *Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation?* Theriogenology, 61: 277-291.

Riferimenti bibliografici

Park SE, Lee KA, Son WY, Ko JJ, Lee SH, Cha KY. "Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the *germinal vesicle stage*". Fertility and Sterility 1995, **68**: 920-6.

Parkes AS, Smith AU. *Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperature*. Proc Roy Soc 1953; 14: 455-70.

Parkes AS. *Viability of ovarian tissue after freezing*. Proc Roy Soc Lond Ser B 1957; 147:520-528.

Parrot DMV (1960) *The fertility of mice with orthotopic ovarian graft derived from frozen tissue*. J Reprod Fertil, 1: 230-241.

Parrot DMV. *The fertility of mice with orthotopic ovarian graft derived from frozen tissue*. J Reprod Fertil 1960; 1: 230-41.

Paynter SJ (2000) *Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes* Human reprod. 6(5)449-56

Paynter, SJ, Borini A, Bianchi V, De Santis L, Flamigni C and Coticchio G. (2005) *Volume changes of mature human oocytes on exposure to cryoprotectant solutions used in slow cooling procedures*. Human Reproduction 20,1194-1199.

Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A and Currie J (1990) *Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte*. Fertil Steril, 54: 102-108.

Pickering SJ, Johnson MH. *The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of mouse oocytes*. Hum Rep 1987 2(3):207-16

Polge C. (1952) *Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C*. Nature 169;626-627

Porcu E (2005) *Cryopreservation of oocytes: indications, risks and outcome*. Abstracts of the 21st Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Hum Reprod 20 (Suppl 1), i50: O-137.

Riferimenti bibliografici

Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O and Flamigni C (1997) *Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes*. Fertil Steril, 68: 724–726.

Quinn P, Kerin JF. *Experience with the cryopreservation of human embryos using mouse as a model to establish successful techniques*. J In Vit Fer Emb Tran 1986 3(1); 40-45

Radford JA, Lieberman BA, Brison D, Smith AR, Critchlow JD, Russell SA, Watson AJ, Clayton JA Harris M, Gosden GR(2001) *Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma*. Lancet 357,1172-75

Radford JA, Lieberman BA, Brison DR, Smith AR, Critchlow JD, Russell SA et al (2001) *Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose chemotherapy for Hodgkin's lymphoma*. Lancet, 357: 1172–1175.

Rall WF (1987) *Factors affecting survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification*. Cryobiology, 24: 387–402.

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

Riboli E, Hunt KJ, Slimani N, Ferrari P, Norat T, Fahey M, Charrondiere UR, Hemon B, Cassagrande C, Vignat J, et al. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collectio*. Pub Health Nutr 2002;5:1113-1114

Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J, Greco E. *Poloscope analysis of meiotic spindle changes living metaphase II human oocytes during the freezing and warming procedures*. Hum Rep 2004 19 (3); 655-9

Rutherford AJ and Gosden RG (1999) *Ovarian tissue cryopreservation: a practical option?* Acta Paediatr Suppl, 433: 13-18.

Shaw J.M. In Trounson A. and Gardner. *Handbook of in Vitro Fertilization*. CRC Press Boca Raton Florida, 1993).

Sobrinho LG, Levine RA and DeConti RC (1971) *Amenorrhea in patients with Hodgkin's disease treated with antineoplastic agents*. Am J Obstet Gynecol, 109: 135-139.

Stachecki JJ and Cohen J (2004) *An overview of oocyte cryopreservation*. Reprod Biomed Online, 9: 152–163.

Stachecki JJ, Cohen J and Willadsen M (1998) *Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium*. Cryobiology, 37: 346-354.

Thomson AB, Critchley HO, Kelnar CJ and Wallace WHB (2002) *Late reproductive sequelae following treatments of childhood cancer and options for fertility preservation*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 16: 311–334.

Toner M, Cravalho EG, Stachecki J, Fitzgerald T, Tompkins RG, Yarmush ML and Armant DR (1993) *Nonequilibrium freezing of one-cell mouse embryos: Membrane integrity and developmental potential*. Biophys J, 64: 1908–1921.

Trounson A, Mohr L. *Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of eight cell embryo*. Nature 1983 26; (305) 707-9

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Greve T, Callesen H. *Open pulled straws vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryo*. 1998 51(1):53-58

Valojerti MR, Salehenia M. *Developmental potential and ultrastructural injuries of metaphase II mouse oocytes after slow freezing or vitrification*. J Ass Rep Gen 2005 22; 119-27

Van Asselt KM, KokHS, Pearson PL, Dubas JS, Peeters PH, te Velde ER, van Noord PA. *Heritability of menopause age in mothers daughters*. Fertil Steril 2004;82:1348-1351

Van Blerkom J and Davis PW (1994) *Cytogenetic, cellular, and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes*. Microsc Res Tech, 27 (2): 165-193.

Van der Elst J (2003) *Oocyte freezing: here to stay?* Hum Reprod Update, 9: 463–470.

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

Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH and Quick SJ. (1990) *Dimethylsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocyte*. Mol Reprod Dev., 26(3):227-235.

Wallace WH and Thompson AB (2003) *Preservation of fertility in children treated for cancer*. Arch Dis Child, 88: 493– 496.

Wang X, Chen H, Kim SS, Lin Tan S and Godsen (2002) *Fertility after intact ovary transplantation*. Nature 415,385

Wang X, Chen H, Yin H, Kim SS, Lin TS and Gosden RG (2002) *Fertility after intact ovary transplantation*. Nature, 415: 385.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. (1972)*Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C*.Science 178(59);411-414

Whittingham DG. *Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes is not due premature cortical granules release*. Biol Rep 1977. 49(1); 89-94.

Wolfe SL (1993) *Molecular and Cellular Biology*. Belmont, CA: Wadsworth Publishing Company: 209.

Zeilmaker GH, Alberda AT, Van Gent I, Drogendijk AC. *Two pregnancies following transfer of intact frozen thawed embryos*. Fer Stre 1984; 42(2) 293-6