

## **La crioconservazione degli ovociti: cosa è e a cosa serve.**

Le prime sperimentazioni di tecnologie per la manipolazione in vitro e la crioconservazione di gameti ed embrioni nascono alla fine del XVIII secolo ad opera di un italiano, Lazzaro Spallanzani, il quale, effettuando un esperimento sulle rane, dimostrò che gli spermatozoi conservati nel ghiaccio restavano fertili anche dopo 34 ore.

Da allora sono state condotte numerose sperimentazioni che hanno portato a un concreto sviluppo della crioconservazione soprattutto per quanto concerne quella degli spermatozoi, tanto che a oggi si può contare su un'esperienza ventennale in questo campo.

Più difficile è stato invece il percorso della crioconservazione ovocitaria. Essa può essere effettuata attraverso l'uso di due tecniche: una "tradizionale" detta del "congelamento lento" e una innovativa che si basa invece su un congelamento rapido, definita "vitrificazione". Il nome deriva appunto dall'aspetto trasparente e simile al vetro che assumono i materiali biologici sottoposti a tale procedura.

La procedura tradizionale che si basa sul congelamento lento prevede che gli ovociti, dopo essere stati opportunamente trattati, siano messi in soluzioni chimiche preparatorie e trasferiti in un congelatore biologico, che gradualmente (in tempo più o meno lungo a seconda di come viene programmato), li porta a una temperatura di -150 gradi centigradi e, successivamente vengono immersi in azoto liquido (-196° C).

Lo scongelamento, invece, viene effettuato molto rapidamente per evitare che il campione permanga troppo a lungo a temperature "critiche" che possono provocare la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno della cellula con possibili danni alla zona pellucida (sorta di membrana esterna che racchiude e protegge l'ovocita) o al citoplasma. La formazione di cristalli di ghiaccio, infatti, comporta un'alterazione della struttura della cellula che ne rende difficile la sopravvivenza, e nella maggior parte dei casi, la fecondabilità e successivamente l'avvio della gravidanza. I danni sembrano riguardare soprattutto le strutture interne alla cellula che secondo alcuni porterebbe anche a un'alterazione dei cromosomi - il processo di crioconservazione, infatti, avviene mentre la cellula si sta dividendo - e rendono disfunzionale la cellula al momento della fecondazione. Il modo migliore per evitare la formazione di ghiaccio è quello di sottrarre acqua alla cellula prima di crioconservarla ma purtroppo l'ovocita spesso risponde male alla disidratazione. Altri danni possono essere causati da shock osmotici dovuti al passaggio da temperature bassissime a temperature corporee o dall'accumulo dei componenti chimici contenuti nelle soluzioni per la crioconservazione (crio - protettori) all'interno della cellula che possono avere con un effetto tossico.

Proprio per questi motivi, sono stati concepiti metodi radicalmente alternativi, che consentissero un processo di congelamento molto più rapido e una minimizzazione dei volumi in modo da ridurre il più possibile l'esposizione della cellula a fattori ambientali o chimici. Invece di procedere gradualmente con le fasi di congelamento al fine di mantenere la cellula uovo in una condizione di equilibrio" si è pensato di portarla rapidamente a -196 gradi centigradi, temperatura dell'azoto liquido. In questo modo, la cellula si "vitrifica" cioè si solidifica rapidamente acquistando un aspetto vitreo, trasparente e privo di ghiaccio. Tuttavia, per ottenere questo risultato, le concentrazioni di sostanze chimiche delle soluzioni preparatorie in cui viene immerso l'ovocita sono molto più elevate. Questo ha sollevato dubbi in merito ad un possibile esito tossico.

Inoltre, alcuni ricercatori sono preoccupati per la possibile trasmissione di virus e batteri presenti nell'azoto liquido, che a differenza dei preparati ad hoc non è sterile (questo rischio sembra però facilmente arginabile, evitando il contatto diretto, inserendo cioè le cellule in contenitori isolati ermeticamente).

Nonostante queste possibili reazioni avverse, la vitrificazione degli ovociti, come sottolineato recentemente all'interno delle linee guida pubblicate dall'American Society for Reproductive Medicine (ASRM) e dalla Society for Assisted Reproductive Technology su Fertility and Sterility, una prestigiosa rivista internazionale, in questi ultimi anni, ha ottenuto dei risultati tali da non dover essere più considerata come sperimentale ma accreditata.

Infatti, lo studio effettuato dall'ASRM su giovani donne di età inferiore ai 30 anni non ha evidenziato sostanziali differenze tra i tassi di fertilizzazione e di gravidanze ottenute con l'uso di ovociti freschi e ovociti crioconservati. Inoltre, l'utilizzo di ovociti crioconservati non ha incrementato la nascita di bambini con difetti, anomalie cromosomiche o deficit di sviluppo diversi da quelli nati da ovociti a fresco.

La crioconservazione ovocitaria consente di superare numerosi problemi: da quelli etici e morali, legati alla crioconservazione degli embrioni a quelli associati alla sindrome da iperstimolazione ovarica poiché, congelando gli ovociti soprannumerari, nel caso di fallimento del tentativo di fecondazione, viene evitata un'ulteriore somministrazione delle gonadotropine, ossia quelle sostanze usate per indurre la stimolazione follicolare multipla.

Un altro ambito applicativo del congelamento ovocitario riguarda la preservazione della fertilità nelle pazienti oncologiche. Negli ultimi anni, le nuove strategie antitumorali hanno portato a un progressivo aumento della sopravvivenza media delle giovani donne affette da tumori, purtroppo, gli effetti dei trattamenti chemio - e radioterapici possono danneggiare in maniera imprevedibile il patrimonio genetico degli ovociti. La crioconservazione ovocitaria rappresenta quindi una risorsa importante per le pazienti oncologiche, in quanto consente loro di tentare di

preservare la fertilità, sperando di poter concepire figli in futuro grazie alle tecniche di procreazione medicalmente assistita.

### **Alcuni dati sulla crioconservazione in Italia**

- Il primo bambino nato da ovocita vitrificato in Italia è nato a Bologna nel 1999.
- Dal 2005 al 2011 sono stati crioconservati 180.167 ovociti (9,7% del totale degli ovociti prelevati).
- Dal 2005 al 2011 sono stati effettuati 20.016 cicli da scongelamento di ovociti.
- Dal 2005 al 2011 tramite la crioconservazione ovocitaria sono state ottenute 2.405 gravidanze.
- Nel 2011 il 2,7% dei bambini nati da PMA è nato grazie allo scongelamento degli ovociti.
- Dal 2005 al 2011 sono nati 1.674 bambini grazie all'applicazione della tecnica di scongelamento ovocitario che rappresentano il 3,2% dei nati da tutte le tecniche di PMA nello stesso periodo.
- Nel 2011 il 70,9% degli ovociti congelati è stato crioconservato tramite la tecnica di vitrificazione.

### **Riferimenti bibliografici**

**Al-Hasani S., Ozmen B.,** *Vitrification the slow revolution of rapid freezing*, in “Focus on Reproduction”, (pubblicazione ESHRE), 2007, PP. 22 – 25;

**Al-Hasani S., Ozmen B., Schultez- Mosgau A.,** *Therr year experience of routine vitrification of human zigote: is it still fair to adovcate slow-rate freezing?*, in “Reproductive Biomedicine Online”, 2007, num. 14, 288-293;

**Antinori M, Licata E, Dani G et al.,** *Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries*, in “Reproductive BioMedicine Online”, 2007, 14, 72–79.

**Azambuja R, Badolotti M, Okada L et al.,** *Results of oocyte cryopreservation using choline-based freezing medium*, in “Fertility and Sterility”, 2005, 84 (Suppl. 1), S178.

**Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Bazzocchi A, Venturoli S.,** *Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing*, in “Fertility and Sterility”, 2009, 91:2399–407. Level I.

**Cobo A, Domingo J, Perez S, Crespo J, Remohi J, Pellicer A.**, *Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer Patients*, in “Clinical Translational Oncology”, 2008,10:268–73.

**Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J.**, *Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method*, in “Fertility and Sterility” 2008,89:1657–64. Level I.

**ESHRE Task Force on Ethics and Law, including, W. Dondorp, G. de Wert, G. Pennings, F. Shenfield, P. Devroey, B. Tarlatzis, P. Barri, and K. Diedrich**, *Oocyte cryopreservation for age-related fertility loss*, in “Human Reproduction”, 2012, Vol.27, No.5 pp. 1231–1237;

**Fabrizio R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni .**, *Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival*, in “Human Reproduction”, 2001,16:411–6. Level II-2.

**Ministero della Salute**, *Relazione del Ministro della Salute al Parlamento sullo stato di attuazione della legge contenente norme in materia di procreazione medicalmente assistita (legge 19 febbraio 2004, n. 40, articolo 15)- Attività anno 2011*, Roma, Luglio 2013.

**Noyes N, Porcu E, Borini A.**, *Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies*, in “Reproductive Biomedicine Online”,2009,18:769–76.

**Oktay K, Cil AP, Bang H.**, *Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis*, in “Fertility and Sterility”, 2006,86:70–80. Level III.

**Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology**, *Ovarian tissue and oocyte cryopreservation*, in “Fertility and Sterility”, 2008, 90:S241–6;

**Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology**, *Mature oocyte cryopreservation a guideline*, in “Fertility and Sterility”, 2013 Jan, 99(1):37-43.

**Stoop D, Nekkebroeck J, Devroey P.**, *A survey on the intentions and attitudes towards oocyte cryopreservation for non-medical reasons among women of reproductive age*, in “Human Reproduction”, 2011,26:655–61;