

**VALUTAZIONE DELL' EFFICIENZA CLINICA DELLA CRIOCONSERVAZIONE DI  
OVOCITI E SVILUPPO DI NUOVI PROTOCOLLI DI CRIOCONSERVAZIONE**

**Protocollo dello studio**

**Roma, 23 Settembre 2005**

**BOZZA PRELIMINARE**

## INTRODUZIONE

Le diverse forme di infertilità sono in gran parte risolvibili attraverso la procreazione medicalmente assistita (PMA). Le metodiche di questa disciplina prevedono essenzialmente la stimolazione farmacologica della funzione ovarica per ottenere una crescita multifollicolare, la fecondazione in vitro di ovociti maturi dopo recupero chirurgico, e la crescita in vitro di embrioni preimpianto da trasferire in ambiente intrauterino. In tale contesto, la crioconservazione di embrioni fino all'entrata in vigore della legge 40 del febbraio 2004 era diffusamente praticata, soprattutto per sfruttare il potenziale riproduttivo degli embrioni soprannumerari generati ad ogni singolo ciclo di fecondazione in vitro (IVF), riducendo così la necessità di ripetere i regimi di stimolazione con gonadotropine e i prelievi chirurgici di ovociti. Ma l'opzione di crioconservare embrioni, è stata vietata dalla legge 40. Pertanto, la possibile alternativa di preservare la fertilità attraverso la crioconservazione di ovociti maturi costituisce oggi in Italia, una delle alternative valide e praticabili per tutte le coppie che si rivolgono alle tecniche di PMA.

Gli ovociti sono caratterizzati da aspetti strutturali e funzionali unici, che pongono particolari problemi per la loro crioconservazione. Nonostante diversi autori abbiano descritto l'ottenimento di gravidanze derivanti da ovociti crioconservati, allo stato attuale è largamente prevalente nella comunità medico-scientifica l'opinione secondo cui l'efficienza delle metodiche di congelamento di ovociti sia inferiore a quella della conservazione degli embrioni. Ma alcune esperienze cliniche condotte negli ultimi anni, unitamente ad evidenze sperimentali di base, suggeriscono che lo sviluppo di efficaci metodi di congelamento di ovociti possa essere compiuto entro tempi ragionevolmente brevi. Condizione indispensabile per raggiungere tale obiettivo sarà l'ampliamento dei dati clinici attualmente disponibili e la conduzione di studi di criobiologia, allo scopo di definire su basi razionali criteri ideali di crioconservazione.

## OBIETTIVI DEL PROGETTO

### PARTE CLINICA

1. Valutare l'efficienza clinica della crioconservazione degli ovociti, rilevando percentuali di impianto, gravidanza, aborto spontaneo, nati vivi e malformazioni o anomalie alla nascita
2. Confrontare i risultati osservati con uso di embrioni freschi (ottenuti da ovociti non crioconservati) o congelati e con embrioni ottenuti da ovociti crioconservati.
3. Creare una coorte di nati da embrioni prodotti con ovociti crioconservati che potrà essere la base di futuri studi di follow-up pediatrico.
4. Produrre e validare un questionario per la rilevazione dei dati individuali.
5. Preparare e validare un software per l'immissione e il controllo dei dati.
6. Analizzare e valutare l'esito delle gravidanze iniziate nelle donne che si sono rivolte ai centri partecipanti allo studio nei primi 6 mesi.

### PARTE SPERIMENTALE SULLA CRIOBIOLOGIA DEGLI OVOCITI

- 7. Studiare fattori ritenuti svolgere un ruolo essenziale nel determinare l'efficienza del processo di congelamento lento come:**
  - Caratteristiche di permeabilità dell'oolemma, al fine di definire le condizioni ottimali per la deidratazione e reidratazione della cellula durante i processi di congelamento lento e scongelamento, minimizzando allo stesso tempo gli stress osmotici. a) tipo e concentrazione

- di crioprotettore/i; b) tempi e temperature di esposizione ai crioprotettori; c) modalità di esposizione ai crioprotettori (numero di steps)
- Formazione di ghiaccio intra- ed extracellulare in rapporto alla temperatura di seeding.
  - 8. **Sviluppare nuovi protocolli di congelamento lento, al fine di incrementare le percentuali di sopravvivenza** e minimizzare allo stesso tempo gli stress cellulari indotti dalla crioconservazione.
  - 9. **Condurre**, principalmente tramite tecniche di microscopia a fluorescenza ed elettronica, **indagini su potenziali effetti di differenti protocolli di crioconservazione** (convenzionali o sviluppati come descritto al punto “3”) **nei confronti di strutture e attributi funzionali di particolare importanza per la vitalità dell’ovocito**, quali l’apparato citoscheletrico, cromosomi, mitocondri, livelli di calcio intracellulare, granuli corticali e zona pellucida..
  - 10. **Elaborare Procedure Operative Standard (SOP) sulle tecniche di congelamento e scongelamento degli ovociti**
  - 11. **Produrre e validare una scheda di rilevamento dati sulle specifiche procedure di congelamento e scongelamento degli ovociti.**
  - 12. **Analizzare e valutare le percentuali di sopravvivenza allo scongelamento e di fertilizzazione, confrontando le diverse tecniche utilizzate.**

## **METODOLOGIA DELLO STUDIO SPERIMENTALE**

- **Messa a punto del modello sperimentale che verrà adottato per il confronto tra procedure al fine di scegliere la piu’ efficiente.**
- **Eventuale ruolo dell’ ISS nell’ analisi statistica, da effettuare con metodi congruenti al modello sperimentale.**