



## **Approccio innovativo alla criopreservazione dei gameti nella procreazione medicalmente assistita: la vitrificazione**

Roberta Rossini, Alessandro Verza, Manuela Piccinino, Mariangela Rampino,  
Monica Prina, Luca Cafaro, Antonella Martino, Cristina Vetrano

*Clinica Ostetrico-Ginecologica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico  
San Matteo, Pavia, Italia*

---

### **Abstract**

#### ***Approccio innovativo alla criopreservazione dei gameti nella procreazione medicalmente assistita: la vitrificazione***

L'obiettivo del nostro studio è di determinare le caratteristiche degli ovociti dopo la criopreservazione, in particolare usando la tecnica della vitrificazione e del congelamento lento. La crioconservazione degli ovociti con la nuova tecnica di vitrificazione ha dato maggiori tassi di sopravvivenza ovocitaria post scongelamento e una più alta percentuale di fertilizzazione rispetto al protocollo precedentemente in uso (congelamento lento), 76.19% vs 29.78%, anche se è richiesta l'estensione numerica del campione preso in esame per confermare quale delle due tecniche sia la più efficace. Alla luce di tali risultati la crioconservazione degli ovociti, in particolare la vitrificazione, può essere eseguita come una tecnica di routine [6].

#### ***Innovative approach to gametes cryopreservation in medically assisted procreation: vitrification***

Object of our study is determining ovocytes features after cryopreservation, especially using vitrification and slow-rate freezing. Ovocytes cryopreservation with the new technique of vitrification has achieved greater ovocytes surviving rates after thaw and a higher fertilization percentage than precedent protocol (slow-rate freezing), 76.19% vs 29.78%, even if numerical extension of the sample is requested to confirm which technique is the most effective. According with these results, ovocytes cryopreservation, in particular vitrification, can be performed as a routine approach.

---

### **Introduzione**

La sterilità di coppia è un problema che sta assumendo sempre più importanza. Si stimano circa 400.000 coppie all'anno desiderose d'aver una prole, e di queste la maggior parte si rivolge a centri specializzati per ottenere la gravidanza.

Nei centri specializzati le pazienti sono sottoposte ad una stimolazione ovarica con lo scopo di ottenere il maggior numero di materiale fecondabile (ovociti), al fine di poter selezionare quello con caratteristiche migliori e quindi aver più possibilità d'ottenere la gravidanza.

Prima dell'ultima revisione del maggio 2009 la legge italiana escludeva e vietava la crioconservazione e la soppressione degli embrioni (articolo 14, comma 1, L40/2004), con l'eccezione della crioconservazione degli embrioni qualora il trasferimento in utero non risultasse possibile per grave e documentata causa di forza maggiore relativa allo stato di salute della donna (ad esempio la patologia oncologica) non prevedibile al momento della fecondazione (articolo 14, comma 3 L40/2004), e comunque da realizzare non appena le condizioni di salute lo consentissero.

La legge italiana non escludeva e attualmente non esclude la crioconservazione degli ovociti e, a tale proposito, lo scopo di questo studio è quello di mettere a confronto le varie possibilità di congelamento e le alterazioni che esse possono portare al materiale fecondabile.

## Materiali e Metodi

La tecnica della crioconservazione induce alla formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare che a loro volta originano forze meccaniche in grado di danneggiare la membrana plasmatica e quella degli organelli intracellulari [1]. Vengono usati a questo proposito i crioprotettori, cioè sostanze diverse capaci di proteggere le cellule dai danni derivanti dalla formazione di cristalli di ghiaccio. Si viene a raggiungere un rapporto tossicità-protezione tale che la cellula sia protetta dai danni del freddo e, contemporaneamente, tolleri la tossicità del crioprotettore [2]. Esistono due diversi tipi di crioprotettori:

- *Permeanti*: molecole di piccole dimensioni che, diffondendo attraverso la membrana plasmatica consentono di abbassare la temperatura alla quale si formano i cristalli di ghiaccio riducendone la formazione; dimetilsolfossido (DMSO), glicerolo (Gly), etilenglicole (EG).
- *Non Permeanti*: molecole che, non penetrando attraverso la membrana plasmatica, producono una condizione di disidratazione cellulare con conseguente riduzione della formazione di ghiaccio durante il congelamento; glucosio, saccarosio, polivinilpirrolidone (PVP), trealosio.

Le due diverse tecniche che abbiamo preso in considerazione sono la criopreservazione mediante congelamento lento e quella mediante vitrificazione.

Il congelamento lento utilizza concentrazioni relativamente basse di crioprotettori, ha una curva di discesa termica per ovociti/embrioni: 0.3-1°C/min, i tassi di sopravvivenza sono variabili, gli svantaggi sono un costo elevato di acquisto e mantenimento dell'attrezzatura (congelatore automatizzato), un lungo tempo (più di 1 ora) necessario per tale procedura.

La vitrificazione utilizza concentrazioni di crioprotettore così elevate da rendere le soluzioni, sottoposte a temperature criogeniche, simili al vetro, senza formazione di cristalli di ghiaccio [4]; l'elevata tossicità delle soluzioni vitrificanti richiede tempi di esposizione molto ridotti ed elevate velocità di discesa termica [5].

Quindi il congelamento lento comporta la formazione di ghiaccio nella soluzione extracellulare, e, in condizioni operative opportune, è resa minima la probabilità che si formi ghiaccio intracellulare, la vitrificazione esclude la formazione di ghiaccio in ogni parte del campione [3].

Abbiamo incluso nello studio 45 pazienti che si sono recate presso il nostro Centro di Procreazione Medicalmente Assistita del Policlinico San Matteo di Pavia, e abbiamo suddiviso questa popolazione in due gruppi: il primo gruppo, costituito da 21 pazienti, sottoposte a FIVET o ICSI tra il 1/3/08 ed il 5/10/08 che hanno espresso il consenso alla criopreservazione di eventuali ovociti recuperati in soprannumero (L 40/2004); il secondo gruppo costituito da una popolazione di controllo di 24 pazienti, resa omogenea per età, FSH in 3° giornata, BMI, che aveva effettuato prelievi ovocitari con successiva criopreservazione degli ovociti in soprannumero mediante crioconservazione lenta, in un periodo an-

tecedente a quello del gruppo 1. Nel gruppo 1 il congelamento è stato realizzato con vitrificazione come descritto da Kuwayama et al. (2005). Delle 21 pazienti, 3 hanno ottenuto la gravidanza al 1° tentativo; delle rimanenti 18, 6 hanno chiesto lo scongelamento: 21 ovociti devitrificati. Nel gruppo 2 su 24 pazienti, 4 hanno ottenuto la gravidanza al 1° tentativo; delle rimanenti 20, 11 hanno chiesto lo scongelamento: 47 ovociti scongelati. In entrambi i gruppi la stimolazione ovarica è stata effettuata mediante la combinazione di un analogo agonista del GnRH (Decapeptyl; Ipsen, Italy) e rFSH (Gonal F; Serono, Italy; Puregon, Organon Netherlands). La crescita follicolare è stata monitorizzata mediante controlli ecografici seriati e contestuale misurazione sierica del 17 $\beta$ -estradiolo. L'ovulazione è stata indotta con rhCG (Ovitrelle 250 mg; Serono, Italy) se almeno tre follicoli avevano un diametro >17mm e concentrazione di 17 $\beta$ -estradiolo corrispondente. Il prelievo ovocitario mediante agoaspirazione eco-guidata in sedazione effettuato 34-36 ore dopo la somministrazione dell'hCG.

Per entrambi i gruppi la preparazione endometriale per il *transfer* dopo scongelamento ovocitario è stata realizzata con la somministrazione di estradiolo valerato *per os* (Progynova 2 mg) partendo dal secondo giorno del ciclo mestruale. Si è considerato ottimale, ai fini del *transfer*, uno spessore endometriale di almeno 8 mm. Dopo il *transfer* si è aggiunta la somministrazione di progesterone naturale per via vaginale (Progeffik 200 mg).

## Risultati

Nella tabella 1 sono riportati i risultati dopo la devitrificazione e lo scongelamento.

Si può osservare come la percentuale di ovociti sopravvissuti e di ovociti fertilizzati sia superiore dopo la devitrificazione rispetto allo scongelamento, e, di conseguenza, come il tasso di fertilizzazione e di gravidanza sia superiore nella prima rispetto alla seconda.

## Discussione

I risultati ottenuti nel nostro Centro sono in accordo con la recente letteratura, che indica come la vitrificazione sia una tecnica rapida, poco costosa, facilmente applicabile, che conserva l'integrità biologica degli ovociti. Tutto questo si traduce in alti tassi di sopravvivenza allo scongelamento e alti tassi di gravidanza.

Questa metodica ha consentito quindi la conservazione di materiale genetico senza potenziali alterazioni di carattere biologico, risultante candidabile a modalità di preservazione del futuro riproduttivo di donne con suscettibilità iatrogena di danno ovarico. Inoltre ha permesso un aumento virtuale della percentuale di gravidanza in pazienti sottoposte ad un unico ciclo di stimolazione ovarica, da cui sono stati recuperati e crioconservati ovociti soprannumerari. Per questo motivo sarebbe auspicabile puntare ad investire maggiori sforzi sullo sviluppo di questa tecnica.

## Tabelle e Figure

	Vitrificazione	Congelamento lento
<i>N Pazienti</i>	6	11
<i>Età</i>	34±2.7	33±3.2
<i>BMI</i>	23±3.1	24±4.1
<i>FSH Basale</i>	24±4.1	9±1.5
<i>Ovociti Scongelati</i>	21	47
<i>Ovociti Anomali</i>	5	33
<i>Ovociti Inseminati</i>	16	14
<i>Ovociti Sopravvissuti</i>	76.19%	29.78%
<i>Ovociti Fertilizzati</i>	13	9
<i>Fertilization rate</i>	81.25%	64.28%
<i>Pregnancy rate</i>	33.33%	20%

**Tabella 1.**

## Bibliografia

1. Steponkus PL, Stout DG, Wolfe J. *Cryo-Letters* 1984; 5: 343-348.
2. Bernard A, Fuller BJ. *Hum Reprod Update* 1996; 2(3): 193-207.
3. Koutlaki N, Schoepper B, Maroulis G et al. Human oocyte cryopreservation: past, present and future. *Reprod Biomed Online* 2006; 13(3): 427-436.
4. Fabbri R, Porcu E, Marsella T et al. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001; 16(3): 411-416.
5. Vajta G, Holm P, Kuwayama M et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51(1): 53-58.
6. Levi Setti PE, Albani E, Novara PV et al. Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* 2006; 21(2): 370-375.