

TECNICHE DI CRIOCONSERVAZIONE RIPRODUTTIVA

Raffaella Fabbri, Patrizia Maria Ciotti, Barbara Di Tommaso, Otello Magrini, Leonardo Notarangelo, Eleonora Porcu, Elena Contro, Stefano Venturoli

Università degli Studi di Bologna, Istituto di Clinica Ostetrica e Ginecologica "P. Sfameni", Servizio di Fisiopatologia della Riproduzione Umana

Indirizzo per corrispondenza: Dott.ssa Raffaella Fabbri

Servizio di Fisiopatologia della Riproduzione Umana, Istituto di Clinica Ostetrica e Ginecologica "P. Sfameni", Università degli Studi di Bologna, Via Massarenti 13, 40138 Bologna

tel: +39 051 6363732; fax: +39 051 301926; e-mail: raffaella.fabbri@unibo.it

ABSTRACT

Reproductive cryopreservation technologies represent very important strategies to save human fertility. Chemio and radioterapy treatments, endometriosis and genetic diseases may reduce reproductive potential in humans.

The cryopreservation of human oocytes overcomes a lot of ethic, moral and legal problems linked to embryo freezing and avoids problems associated to hyperstimulation ovary syndrome. The procedure employs permeant (1,2-propanediol) and non permeant (sucrose) cryoprotectants and a slow cooling/rapid thawing protocol using a computerized cryomachine.

Sperm cryopreservation was the first technology used to save male fertility. The cryopreservation protocols employ a rapid cooling in nitrogen vapours or slow cooling some time using cryomachine after the exposition of the gametes to different cryoprotectants.

In the prepuberal children, the testicular biopsy cryopreservation followed by in vitro maturation of immature germinal cells is the best alternative to save fertility at the moment. Another experimental alternative is the transplant of testicular tissue after thawing to restore in vivo spermatogenesis.

Key words: *cryopreservation, oocyte, sperm, cryoprotectants*

RIASSUNTO

Le tecnologie di crioconservazione riproduttiva rappresentano importanti strategie per la conservazione della fertilità. Infatti, malattie, cicli di chemio e radioterapia e la predisposizione genetica possono ridurre il potenziale riproduttivo degli individui.

La crioconservazione dei gameti necessita di protocolli che prevedono l'uso di crioprotettori e di particolari procedure di congelamento e scongelamento. La crioconservazione degli ovociti umani permette di superare problemi etici, morali e legali legati alla crioconservazione degli embrioni e di evitare i problemi associati alla sindrome da iperstimolazione ovarica. Il protocollo di crioconservazione prevede l'esposizione degli ovociti ad un crioprotettore permeante (1,2 propanediolo) e ad uno non permeante (saccarosio) la membrana cellulare ed un programma di congelamento lento/ scongelamento rapido utilizzando un congelatore programmabile.

La crioconservazione degli spermatozoi è stata la prima tecnologia utilizzata per la conservazione della fertilità maschile. I protocolli di crioconservazione prevedono un congelamento rapido in vapori di azoto oppure un congelamento lento, utilizzando o meno congelatori programmabili, dopo l'esposizione ad un crioprotettore.

Nei pazienti in età prepubere, per i quali la crioconservazione degli spermatozoi non è possibile, l'alternativa è quella di crioconservare le biopsie testicolari da cui si prelevano spermatozoi immaturi che verranno successivamente maturati in vitro. Un'altra ipotetica alternativa è il reimpianto del tessuto testicolare per ripristinare la spermatogenesi in vivo.

Parole chiave: *crioconservazione, ovociti, spermatozoi, crioprotettori*

LA CRIOCONSERVAZIONE DI OVOCITI UMANI

La crioconservazione degli ovociti umani rappresenta una importante alternativa per il trattamento dell'infertilità umana. Essa permette di superare problemi legali, etici e morali legati alla crioconservazione degli embrioni e di evitare i problemi associati alla sindrome da iperstimolazione ovarica. Può, inoltre, essere impiegata per preservare la capacità riproduttiva in pazienti che devono sottoporsi a interventi chirurgici o a trattamenti antineoplastici (cicli di chemio e radioterapia) o che presentano patologie a carico dell'ovaio e dell'endometrio.

Alcune strutture cellulari, quali il fuso meiotico, la zona pellucida e i granuli corticali, possono venire danneggiate durante il processo di congelamento/scongelamento per effetto delle basse temperature e delle sostanze utilizzate come crioprotettori.

I maggiori componenti del citoscheletro sono i microtubuli e i microfilamenti che sono piuttosto sensibili alla diminuzione della temperatura durante il congelamento, alla concentrazione dei crioprotettori ed al tempo di esposizione ai crioprotettori. I danni causati dalla temperatura sui microtubuli sono dati dalla riduzione della dimensione del fuso mitotico, da una disorganizzazione dei microtubuli e da una perdita dei

microtubuli stessi (1). Comunque alcuni studi hanno documentato che c'è una ripolimerizzazione dei microtubuli quando la temperatura viene riportata a 37°C determinando una fertilizzazione normale e un corretto sviluppo embrionale. Per quanto riguarda l'effetto dei crioprotettori sui microtubuli ci sono in letteratura risultati contrastanti: secondo alcuni autori (2) i crioprotettori causano anomalie al fuso meiotico, secondo altri (3) le anomalie del fuso negli ovociti crioconservati non sono superiori a quelle riscontrate negli ovociti non crioconservati e comunque l'esposizione ai crioprotettori non inibisce la fertilizzazione e lo sviluppo embrionale (4).

Non è stata invece riscontrata una depolimerizzazione dei microfilamenti dovuta alla diminuzione della temperatura (1). Hunter (5) afferma che il dimetilsolfossido (DMSO) a 4°C e il propandiole (PROH) a 20°C sono compatibili con la sopravvivenza, la fertilizzazione degli ovociti e il clivaggio degli embrioni.

Gli ovociti crioconservati possono andare incontro a processi di polispermia dovuti ad una riduzione del numero dei granuli corticali, ad alterazioni morfologiche degli stessi e a mancata migrazione dei granuli verso la membrana. Al contrario, può esserci una prematura escitosi dei granuli corticali che può portare ad una intempestiva zona hardening e, conseguentemente, alla riduzione dei tassi di fertilizzazione dopo inseminazione in vitro. Comunque alcuni autori affermano che l'ICSI è in grado di ovviare efficacemente a tali problemi. Kazem (6) ha confrontato le percentuali di fertilizzazione e di clivaggio in 2 gruppi di ovociti inseminati, il primo gruppo con una tecnica convenzionale di fertilizzazione in vitro (IVF), e il secondo gruppo con una tecnica di inseminazione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI). In entrambi i gruppi tutti gli ovociti erano maturi (stadio di metafase II) e sopravvissuti al congelamento. Kazem ha dimostrato che le percentuali di fertilizzazione e di clivaggio aumentano significativamente utilizzando la ICSI. Porcu (7) riporta la prima nascita dopo ICSI di ovociti crioconservati a dimostrare che la combinazione di una buona tecnica di crioconservazione e della ICSI possono rappresentare nuovi strumenti nella procreazione medicalmente assistita.

La crioconservazione non induce una incidenza di anomalie cromosomiche maggiore di quanto avvenga con ovociti non crioconservati (1) così come non c'è un aumento della frequenza di aneuploidie (8).

Per quanto riguarda l'attivazione partenogenetica, Bernard (1), afferma che dopo una procedura di congelamento lento si registra una bassa percentuale di attivazione partenogenetica ed Hunter (9, 10) conferma che non c'è attivazione partenogenetica dopo l'esposizione a concentrazioni alte di crioprotettori, come avviene nelle procedure di vitrificazione. Gook (11) afferma che il PROH non causa attivazione partenogenetica mentre altri autori (12, 13) hanno riscontrato che l'esposizione al PROH determina lo sviluppo di grosse bolle negli ovociti che possono far pensare ad una attivazione partenogenetica.

Il tasso di sopravvivenza degli ovociti dopo congelamento può essere influenzato da fattori morfologici e biofisici. Tra i fattori morfologici particolarmente importanti sono le caratteristiche dell'ovocita come la maturità, la qualità e le dimensioni dell'ovocita. Maturità: le procedure di congelamento e i crioprotettori possono danneggiare il fuso meiotico portando a dislocazioni cromosomiche o ad aberrazioni ed aneuploidie. Qualità: gli ovociti umani maturi mostrano una grande eterogeneità nella distribuzione e organizzazione degli organelli citoplasmatici e una gran variabilità nella permeabilità della membrana all'acqua che può influire sulla qualità morfologica degli ovociti. Dimensioni: un altro fattore che sembra influenzare il processo di congelamento dell'ovocita è il rapporto tra l'area di superficie e il volume: più grandi sono le dimensioni dell'ovocita più bassa è la sopravvivenza dopo congelamento e

scongellamento.

Il principale fattore biofisico che può determinare la distruzione cellulare durante il processo di crioconservazione è la formazione di ghiaccio intracellulare che può essere evitata attraverso l'incremento del processo di disidratazione cellulare, processo che può essere influenzato dalla presenza dei crioprotettori nelle soluzioni di congelamento e dalla velocità del processo di congelamento e scongelamento.

I crioprotettori possono essere divisi in due gruppi: permeanti la membrana (PROH, DMSO, glicerolo, glicole etilenico) e non permeanti la membrana (saccarosio, glucosio, amido, ficoll, proteine e lipoproteine). I crioprotettori permeanti agiscono attraverso differenti meccanismi: 1) abbassano il punto di congelamento della soluzione; 2) interagiscono con le modificazioni della membrana che avvengono durante il processo di crioconservazione (da uno stato relativamente fluido ad uno stato relativamente rigido); 3) prevengono l'esposizione dell'ovocita alle alte concentrazioni di elettroliti sia intra che extra cellulari poiché essi si legano agli elettroliti e si sostituiscono parzialmente all'acqua. I crioprotettori permeanti, come il PROH, penetrano rapidamente nella cellula tramite osmosi e l'acqua ne esce ancor più rapidamente. I crioprotettori non permeanti (saccarosio) sono rappresentati da molecole di grandi dimensioni che non permeano la membrana cellulare. Essi aumentano la concentrazione di soluti extra cellulari generando un gradiente osmotico, attraverso la membrana cellulare, che conduce l'acqua fuori dalla cellula causando la disidratazione cellulare prima della procedura di congelamento. Inoltre la concentrazione del crioprotettore non permeante nella soluzione di congelamento è molto importante dal momento che determina la velocità di disidratazione dell'ovocita: più alta è la concentrazione del crioprotettore, più basso è il potenziale chimico dell'acqua, più l'ovocita si disidrata rapidamente poiché l'acqua rapidamente lascia il citoplasma per diluire l'alta concentrazione di soluti extra cellulari. La presenza di agenti non permeanti nella soluzione di congelamento guida la disidratazione della cellula che perde acqua, fino al congelamento dell'acqua extra cellulare. È importante stabilire quale sia il tempo ottimale di esposizione dell'ovocita alle soluzioni di congelamento. Esso deve essere abbastanza lungo per permettere una sufficiente disidratazione della cellula ma non troppo da danneggiare la cellula dal momento che si può alterare il pH intracellulare.

Mazur (14) mostra che un congelamento sufficientemente lento determina una progressiva disidratazione ed evita la formazione di ghiaccio intracellulare. Al contrario, se la cellula è congelata più rapidamente, il tempo per il trasporto di acqua all'interno e l'equilibratura può essere insufficiente e nella cellula si formano nuclei di ghiaccio. Una procedura di congelamento molto rapida riduce i danni da formazione di ghiaccio in quanto determina la formazione dei cristalli di ghiaccio solo all'esterno dell'ovocita.

Il problema che può sorgere durante la procedura di scongelamento è la ricristallizzazione. Dall'acqua che è rimasta nell'ovocita durante il congelamento possono formarsi dei cristalli di ghiaccio che possono ridurre la sopravvivenza degli ovociti congelati. La formazione di ghiaccio intracellulare avviene più probabilmente se lo scongelamento è lento, in quanto in questo modo si dà il tempo ai piccoli cristalli di ghiaccio di riunirsi in cristalli di ghiaccio più grandi danneggiando l'ovocita. Il processo di scongelamento deve essere veramente rapido (circa 275°C/min.) per permettere una dispersione rapida dei cristalli di ghiaccio intracellulari, contemporaneamente il ghiaccio extracellulare si scioglie e permea la membrana cellulare in uno stato liquido per reidrattare l'ovocita.

Un altro fattore che incide sulla sopravvivenza degli ovociti dopo lo scongelamento è la rimozione del crioprotettore. Quando un ovocita che contiene un'alta concentrazione di crioprotettore è messo in un mezzo

contenente una bassa concentrazione di crioprotettore, l'acqua entra nella cellula per diluire il crioprotettore più rapidamente di quanto il crioprotettore lasci la cellula e questo provoca il rigonfiamento o perfino lo scoppio dell'ovocita. La rimozione del crioprotettore in una serie di tappe a concentrazioni progressivamente più basse di crioprotettore riduce la forza del rigonfiamento. La presenza di un'alta concentrazione di molecole non permeanti (quali il saccarosio) che controbilanciano l'alta concentrazione del crioprotettore nella cellula riduce lo shock osmotico e controlla l'afflusso di acqua all'interno della cellula.

Ci sono tre principali protocolli di congelamento in letteratura: la vitrificazione, il congelamento rapido e ultrarapido e il congelamento lento. La vitrificazione può essere definita come un processo fisico nel quale una soluzione estremamente concentrata di crioprotettore si solidifica durante il raffreddamento formando uno stato simile al vetro senza la formazione di cristalli di ghiaccio. Nella vitrificazione il principale crioprotettore utilizzato è l'etilene glicole.

Concentrazioni di crioprotettori più basse (intermedie tra quelle usate per congelamento lento e quelle usate per la vitrificazione) sono utilizzate nelle procedure di congelamento rapido o ultrarapido. Queste, oltre a concentrazioni di soluto più basse, prevedono una più breve esposizione per ridurre i problemi di tossicità dei crioprotettori.

Per quanto riguarda il congelamento lento sono stati usati come crioprotettori il DMSO e il PROH. Inizialmente fu usato il DMSO, poi fu abbandonato a causa della sua tossicità. Risultati migliori, in termini di sopravvivenza, clivaggio e percentuale di gravidanze, sono stati ottenuti usando il PROH.

Un passaggio molto importante nel programma di congelamento di ovociti umani è l'induzione del seeding (formazione di ghiaccio nella soluzione esterna) che si realizza toccando la parete della paillette con un oggetto raffreddato a -196°C . Il seeding induce la progressiva formazione di ghiaccio extracellulare e, di conseguenza, la concentrazione dei soluti nella frazione di acqua non congelata. Questo impedisce il supercongelamento e dà inizio al processo di disidratazione della cellula grazie al gradiente osmotico che si genera attraverso la membrana cellulare. Attraverso un congelamento sufficientemente lento quasi tutta l'acqua disponibile può essere rimossa dalla cellula con il risultato che la cellula non viene danneggiata quando immersa nell'azoto liquido.

Il nostro protocollo di crioconservazione è un protocollo di congelamento lento/scongelo rapido con 1,2 propandiole 1.5 M e saccarosio 0.3 M come crioprotettori.

Nelle prime fasi del nostro protocollo sperimentale, che utilizzava PROH 1.5 M e saccarosio 0.2 M, la percentuale di sopravvivenza ovocitaria dopo congelamento/scongelo non ha evidenziato differenze quando gli ovociti sono stati crioconservati con il cumulo parzialmente rimosso meccanicamente (56%) rispetto a quelli crioconservati con il cumulo ooforo totalmente rimosso enzimaticamente utilizzando ialuronidasi (53%) (15). Poiché la presenza del cumulo non influenza la sopravvivenza è preferibile congelare gli ovociti privati del cumulo così da poter valutare il loro stadio maturativo. Una percentuale di sopravvivenza significativamente più alta è stata ottenuta negli ovociti crioconservati in una soluzione contenente una concentrazione di saccarosio 0.3 M (80%) rispetto ad una soluzione contenente saccarosio 0.2 M (57%) (16).

Gli ovociti sopravvissuti allo scongelamento e in metafase II vengono inseminati mediante la procedura di iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI).

La percentuale di ovociti fertilizzati normalmente è del 70-75%, percentuale simile a quella ottenuta da ICSI di ovociti freschi. La percentuale di fertilizzazioni anomale (un pronucleo con uno o due globuli polari oppure tre o più pronuclei) è circa l'8-9%, esattamente sovrappo-

nibile alla percentuale che si ottiene inseminando gli ovociti freschi. La percentuale di clivaggio è del 90% e gli embrioni di buona qualità rappresentano circa il 75%. Con questo protocollo si è ottenuta una percentuale di gravidanza assolutamente comparabile a quella ottenuta con il trasferimento di embrioni scongelati, per cui si può ipotizzare che ben presto il congelamento degli embrioni possa essere sostituito dal congelamento degli ovociti.

Questi risultati ci permettono di essere ottimisti riguardo alla futura applicazione clinica del protocollo di congelamento degli ovociti.

LA CRIOCONSERVAZIONE DI SPERMATOZOI

La crioconservazione degli spermatozoi è una tecnica che da più di 50 anni rappresenta un'importante metodica per la salvaguardia della fertilità maschile. La tappa più importante nella crioconservazione del liquido seminale fu la scoperta di Polge et al (17) dell'efficacia del glicerolo come agente crioprotettivo per il seme bovino. Poco tempo dopo Sherman dimostrò con successo la crioconservazione degli spermatozoi umani in ghiaccio secco (a -78°C), seguita da un normale scongelamento. Sempre Sherman descrisse l'uso di vapori di azoto liquido per il congelamento e ottenne la prima gravidanza attraverso l'inseminazione intra-uterina con spermatozoi scongelati (18). Da allora ci sono stati molti sviluppi nelle metodiche che hanno portato al perfezionamento della tecnica di crioconservazione.

La crioconservazione del liquido seminale viene applicata in diverse situazioni:

- 1) preservare il potenziale riproduttivo prima di chemioterapie, terapie radianti o chirurgiche che potrebbero rendere sterile un individuo;
- 2) pazienti che devono sottoporsi ad un intervento di vasectomia;
- 3) pazienti affetti da azoospermia secretoria o escretoria che possono accedere alle tecniche di Fecondazione Assistita;
- 4) pazienti che devono intraprendere un trattamento di Procreazione Medicalmente Assistita e scelgono di congelare preventivamente il campione di liquido seminale per evitare inconvenienti dovuti ad una mancata produzione (stress da raccolta, emotività, indisponibilità fisica al momento del prelievo ovocitario);
- 5) preservare la fertilità in via precauzionale in individui che per diversi motivi (es lavorativi) sono esposti ad agenti esterni (es agenti chimici) che possono danneggiare il loro potenziale riproduttivo;
- 6) pazienti affetti da sindrome di Klinefelter.

La capacità di una cellula di sopravvivere al congelamento dipende dalla sua forma e dimensione, dalla quantità di acqua in essa contenuta e dalle proprietà permeabili della membrana. Il congelamento è un evento stressante per tutti i tipi di cellule ma gli spermatozoi, grazie al piccolo volume cellulare e alla compatta organizzazione cellulare della testa (eterocromatizzazione del nucleo e scarso citoplasma), subiscono pochissime variazioni di struttura durante tale processo. Nonostante questo, al momento dello scongelamento, essi presentano alcune alterazioni e una riduzione della motilità complessiva (30-50%). Inoltre ogni campione seminale non avrà più le stesse capacità fecondanti e potranno verificarsi variazioni di qualità anche tra campioni diversi appartenenti allo stesso paziente. Le variazioni della qualità post-congelamento non dipendono dalla tecnica di congelamento utilizzata ma dalle caratteristiche biochimiche del campione stesso. Infatti, migliori sono le caratteristiche basali del liquido seminale, migliori saranno i risultati in termini di recupero di spermatozoi mobili, pur utilizzando metodiche di congelamento e scongelamento differenti che creano il minor danno cellulare possibile.

Il problema biologico della crioconservazione di materiale cellulare è rappresentato dal possibile danno che le basse temperature provocano

sulle cellule nemaspermiche. Per ovviare a tali danni si ricorre a metodologie che proteggono il materiale biologico dallo shock termico (uso di sostanze crioprotettive e idonei tempi e procedure di congelamento e scongelamento).

In campo seminologico, la possibilità di congelare la cellula nemaspermica è basata sull'impiego di vari terreni di crioconservazione. Questi hanno in comune lo scopo di preservare lo spermatozoo dalla disidratazione e dall'aumento della concentrazione di sali (glicerolo, glicina, saccarosio, ecc.), di proteggerlo dallo shock termico (tuorlo d'uovo, glicerolo, glicina), di salvaguardare l'integrità della membrana cellulare, soprattutto nella parte lipoproteica (tuorlo d'uovo, glicerolo) e di ottimizzare l'osmolarità nei fluidi extracellulari (zuccheri, sali, ecc).

La cinetica di entrata e di uscita del crioprotettore dipende dalla temperatura. L'interazione del crioprotettore con il calo di temperatura dipende dalla permeabilità all'acqua della membrana così come dalla superficie e dal volume della cellula considerata.

CRIOPROTETTORI

Il glicerolo è il crioprotettore più utilizzato per gli spermatozoi umani. Esso è un crioprotettore permeante che agisce sulla struttura della membrana, sulla permeabilità e stabilità del doppio strato lipidico, sull'associazione delle proteine di superficie e sul metabolismo cellulare. Se usato da solo dà un risultato sfavorevole per la sopravvivenza, per la membrana e per l'acrosoma, ma il suo utilizzo permette il congelamento anche di spermatozoi di scarsa qualità. Studi di Sherman hanno messo in evidenza che l'utilizzo di solo glicerolo provoca alcune alterazioni come: la presenza di una membrana ondulata, la membrana acrosomale interna non si presenta più parallela alla membrana esterna, il nucleo appare disomogeneo, si presentano alterazioni dei mitocondri, del manicotto mitocondriale e le creste appaiono disorganizzate (19). In seguito a queste osservazioni sono utilizzate altre sostanze protettive: il dimetilsolfossido (DMSO), che possiede effetti deleteri sugli spermatozoi umani anche se usato a 4°C; il propandiole (PROH) è invece poco usato nella crioconservazione degli spermatozoi.

ZUCCHERI

Gli zuccheri sono crioprotettori non permeanti. Sono molecole molto grandi, con elevato peso molecolare, che favoriscono la disidratazione cellulare durante il raffreddamento. Hanno diverse funzioni: contribuiscono all'osmolarità, forniscono energia allo spermatozoo, infatti, il glucosio e il fruttosio sono zuccheri glicosilabili perciò ossidabili per lo spermatozoo.

PROTEINE E LIPIDI

Permettono di diminuire la concentrazione di glicerolo.

Il tuorlo d'uovo di gallina, che viene spesso incluso nel medium di crioconservazione, non è di per sé un crioprotettore, ma sembra conferire maggiore fluidità alle membrane citoplasmatiche degli spermatozoi, grazie alla componente fosfolipidica delle proteine; ripara la membrana scambiando acidi grassi con la membrana stessa; controlla la concentrazione di ioni Ca^{2+} intracellulare diminuendone l'accumulo dovuto al freddo (protegge le membrane sia dal punto di vista strutturale che funzionale). È presente in quasi tutti i medium dal 3 al 25% secondo la specie.

Alcuni Autori hanno constatato che una migliore sopravvivenza allo scongelamento può essere ottenuta col tuorlo d'uovo in assenza di glicerolo (19).

ALTRE SOSTANZE BIOLOGICHE

Antiossidanti: evitano la perossidazione lipidica creando legami con dei lipidi insaturi, ma in realtà essi sono tossici ed interferiscono con la fluidità della membrana.

Detergenti non ionici: solubilizzano il tuorlo d'uovo

Aminoacidi e peptidi: la glicina al 2% migliora la sopravvivenza in vitro e aumenta la fertilità; anche la cisteina e il glutatione vengono usati come antiossidanti.

Elettroliti e sali: i medium chiamati zwitterionici favoriscono la disidratazione cellulare.

Agenti antimicrobici: a largo spettro, per prevenire la proliferazione microbica. Lo scopo è eliminare la flora patogena che produrrebbe delle tossine utilizzando i differenti componenti del diluente come substrato metabolico.

Altre sostanze: enzimi (amilasi) e stimolanti metabolici (caffaina, calli creina, prostaglandine).

È importante tamponare il pH del medium di crioconservazione durante il congelamento per evitare danni agli spermatozoi.

Le tecniche di congelamento maggiormente utilizzate sono: 1) il metodo rapido; 2) il metodo lento; 3) il metodo lento automatizzato.

- 1) Il congelamento rapido fu proposto per la prima volta da Sherman (19). Questa tecnica prevede che le paillettes vengano lasciate a contatto dei vapori di azoto per circa 8-10 min e, successivamente, immerse in azoto liquido a -196°C. Durante la fase di raffreddamento le paillettes possono essere mantenute verticalmente o orizzontalmente. La posizione orizzontale è preferibile per rendere minima la differenza termica tra le 2 estremità. Il fondo di un contenitore a imboccatura larga viene riempito di azoto liquido. Nei vapori di azoto esiste un gradiente termico in funzione della distanza e al volume del liquido sottostante. Le paillettes sono poste ad una distanza di 15-20 cm dal liquido. La velocità di congelamento è rapida (circa 20°C/min). Dopo questa fase le paillettes vengono immerse in azoto liquido. Questa tecnica presenta alcuni svantaggi come, ad esempio, una scarsa riproducibilità. Infatti, la curva di discesa non è controllabile e le temperature di congelamento possono variare da -70, -80, -99°C.
- 2) Il congelamento lento fu proposto da Behrman e Sawada (20). Il campione seminale, addizionato di crioprotettori, viene portato a 4°C in 20-30 min; in seguito la temperatura viene abbassata fino a temperature da -40°C a -80°C in circa 5-10 °C/min e, infine, immerso in azoto liquido a -196°C.
- 3) Il congelamento lento automatizzato prevede l'utilizzo di congelatori programmabili tramite i quali il campione seminale viene gradualmente raffreddato ad una velocità compresa fra 1°C e 10°C/min sino ad arrivare ad una temperatura simile a quella dell'azoto liquido e all'immersione in azoto liquido a -196°C.

Alcune metodologie prevedono anche un seeding manuale per indurre il primo nucleo di cristallizzazione.

Qualunque sia la metodica utilizzata è indispensabile effettuare correttamente tutte le fasi pre e post crioconservazione per ottenere il migliore risultato. Tali fasi prevedono uno studio seminologico accurato, la scelta del terreno crioprotettivo più adeguato, il corretto condizionamento propedeutico al congelamento e, infine, lo scongelamento.

Per condizionamento si intende le fasi di aggiunta del crioprotettivo al liquido seminale. Il volume di crioprotettore aggiunto è in genere pari al volume del liquido seminale da crioconservare. È necessario che il terreno di crioconservazione interagisca con le cellule, infatti, l'efficacia delle sostanze crioprotettive è anche funzione del tempo di interazione tra il crioprotettore e le cellule. Per evitare shock osmotici, il terreno crioprotettivo viene aggiunto goccia a goccia e miscelato delicatamente a temperatura ambiente, poi viene posto a 37° C per 10-15 minuti per permettere l'equilibratura tra le cellule e il terreno.

Come dice la Professoressa Gandini, del gruppo del Prof Dondero (Policlinico "Umberto I", Università di Roma "La Sapienza"), la tecnica di scongelamento è un punto altrettanto importante perché deve con-

sentire alle cellule di recuperare le normali attività biologiche limitando quanto più possibile rapide differenze di temperatura. Infatti, al fine di evitare bruschi sbalzi termici è necessario estrarre lentamente le paillettes dall'azoto liquido e consentire il raggiungimento dell'equilibrio termico tra materiale cellulare ed ambiente esterno. Attualmente vengono impiegate varie tecniche di scongelamento, tra cui ricordiamo: lo scongelamento a T ambiente per 10 min e il successivo passaggio in termostato a 37°C per altri 10 min; lo scongelamento in termostato a bagnomaria a 37°C per 10 min; lo scongelamento a T ambiente (22°C) per 15 min. Una volta scongelato il liquido seminale viene separato dal terreno di crioconservazione mediante lavaggi con terreno di coltura e centrifugazione.

I dispositivi per crioconservare il liquido seminale sono :

- 1) ampolle;
- 2) paillettes;
- 3) zona pellucida;
- 1) Le ampolle di vetro sono stati i primi contenitori usati. Sono fiale di vetro che contengono 1-1.5 ml di liquido seminale prediluito. Presentano l'inconveniente che le cellule all'interno dell'ampolla sono sottoposte ad una differente temperatura rispetto a quella delle cellule vicine alle pareti. Attualmente le ampolle non vengono più utilizzate a causa della loro fragilità.
- 2) Il sistema di stoccaggio più usato è costituito da paillettes, da 0,25 o 0,5 ml, paillettes ad alta sicurezza, da 0,3 ml, o da cryovials da 2 ml. La paillette viene caricata manualmente attraverso una siringa graduata (1ml) o automaticamente attraverso una pompa ad aspirazione continua. Dopo essere state riempite vengono sigillate con tappi di resina polimerica o tramite termosaldatura ad entrambe le estremità.
- 3) Cohen (21) propose un altro metodo per la crioconservazione di un singolo spermatozoo o di un piccolo gruppo di spermatozoi. Consiste nell'iniettare lo spermatozoo in una zona pellucida vuota umana, di topo o di hamster previa aggiunta di crioprotettori. Questo tipo di tecnica è indicata in caso di campioni con un esiguo numero di spermatozoi e nel caso di spermatozoi testicolari tuttavia si rivela costosa sia in termini di tempo che di materiali.

Se nei pazienti in età post-pubere la crioconservazione del seme è in genere la tecnica più indicata, esistono situazioni i cui non si ottengono, o non si possono ottenere, spermatozoi eiaculati. In questi casi è indicata la crioconservazione del tessuto testicolare o di spermatozoi estratti dal tessuto testicolare. Inoltre, la crioconservazione del tessuto testicolare è l'unica alternativa per preservare la fertilità nei pazienti in età prepubere che devono sottoporsi a trattamenti di chemioterapia o radioterapia, e che rischiano quindi di perdere la capacità di produrre spermatozoi. Infatti, circa il 70% dei pazienti sottoposti a chemioterapia o radioterapia riesce a guarire, ma la maggior parte di questi si ritrova con danni permanenti alle gonadi.

La metodica più utilizzata per la crioconservazione di tessuto testicolare è stata proposta dal gruppo del Prof Dondero, (Policlinico "Umberto I", Università di Roma "La Sapienza"). Dopo biopsia testicolare, il materiale biotico, posto in una piastra Petri contenente un terreno di coltura, viene sminuzzato in piccoli frammenti e poi osservato al microscopio invertito per evidenziare la presenza di spermatozoi. Il terreno di coltura contenente gli spermatozoi viene aspirato e trasferito in una provetta sterile. Si aggiunge goccia a goccia il terreno di crioconservazione (Yolk Buffer) alla diluizione 1:2. La sospensione viene miscelata delicatamente e poi aspirata nelle paillettes che vengono sigillate e poi congelate secondo il metodo rapido o lento. La fase di scongelamento prevede il trasferimento delle paillettes dall'azoto liquido alla T ambiente. A scongelamento avvenuto il contenuto delle pailletes viene trasferito in una

provetta sterile, diluito delicatamente con il terreno di coltura e centrifugato a 300 g per 10 min al fine di rimuovere il terreno di crioconservazione. Al termine della centrifugazione si decanta il surnatante e si risospende il pellet con lo stesso terreno di coltura; tale materiale potrà essere utilizzato per la fecondazione in vitro.

Allan et al (22) prelevarono delle sezioni di tubuli seminiferi da 6 pazienti azoospermici per aspirazione. I tubuli così prelevati furono poi trasferiti in piastre Petri contenenti HTF modificato (protein-free) e una piccola porzione fu processata per confermare la presenza di spermatozoi. Successivamente, i tubuli furono trasferiti in cryovials contenenti 0.5 ml di medium di congelamento per spermatozoi. Tale medium, tamponato, era composto da glicerolo, saccarosio, glicina, antibiotici e da una miscela di sali. Dopo 30 minuti di equilibratura a temperatura ambiente, i vials furono trasferiti in un freezer a -20°C per 30 minuti e successivamente posti in vapori di azoto per altri 30 minuti, prima di essere stoccati definitivamente in azoto liquido. I campioni furono scongelati lasciando i vials a temperatura ambiente per 15 minuti, e subirono poi un lavaggio in HTF supplementato con il 10% di siero materno. Vennero poi estratti gli spermatozoi tramite spremitura dei tubuli, e tutte le cellule con il medium vennero centrifugate per 15 minuti a 300 g. Il pellet fu rimosso, risospeso con 1 ml di HTF e omogeneizzato con una pipetta per rompere i clampi di cellule. Gli spermatozoi così ottenuti furono processati tramite Puresperm 80% supplementato con il 10% di siero materno. Da tutti i pazienti si ottennero un numero adeguato di spermatozoi mobili estratti dai tubuli congelati e scongelati. Le ICSI effettuate con tali spermatozoi e con gli ovociti delle proprie partners risultarono in un tasso di fertilizzazione del 46% (confrontabile con il 56% ottenuto per altri pazienti utilizzando spermatozoi testicolari freschi); inoltre si ottennero 3 gravidanze risultanti da 5 Embryo Transfer. Oates et al (23) eseguirono uno studio su 10 pazienti affetti da azoospermia non-ostruttiva, nel cui tessuto testicolare era stata rilevata la presenza di spermatozoi al momento della TESE. Questi pazienti avevano scelto di utilizzare i loro campioni di tessuto congelato come fonte di spermatozoi per cicli successivi di ICSI. Una volta prelevato, il campione di tessuto fu diviso in pezzi di 0.4 mm e posto in 1 ml di Test Yolk Buffer (TYB) in provette coniche da 12 ml. I campioni di tessuto furono lasciati riposare per alcuni minuti e il surnatante venne poi prelevato, osservato per rilevare la presenza di spermatozoi e infine portato ad una concentrazione finale di glicerolo del 10% (v/v), prima di essere raffreddato a 4°C. Il materiale biotico invece fu trasferito in provette con 1 ml di glicerolo sterile (10% v/v) in TYB e il tessuto fu omogeneizzato utilizzando un pesto (pestle) di vetro e tramite ripetute aspirazioni attraverso un ago ipodermico. Se venivano osservati spermatozoi, l'omogenato veniva portato ad un volume finale di 5 ml di TYB-glicerolo e aliquote di 500 microlitri o di 1 ml venivano trasferite in cryovials e raffreddate a 4°C in un frigorifero. Utilizzando un congelatore programmabile, i campioni furono poi congelati alla velocità di -1°C/min fino a -7°C, temperatura alla quale fu indotta la formazione dei cristalli di ghiaccio (seeding). La temperatura fu poi abbassata a -30°C alla velocità di -1°C/min e infine fu portata a -150°C alla velocità di -5°C/min. I cryovials furono poi stoccati direttamente in azoto liquido. Il tessuto omogeneizzato fu scongelato a temperatura ambiente, diluito con 4 volumi di DPBS:BSA e centrifugato a 250 g per 10 minuti. Il risultante pellet fu risospeso con 500 µl di DPBS:BSA. In 19 cicli di ICSI, il tasso di fertilizzazione complessivo fu del 48%, mentre il trasferimento di embrioni avvenne nel 89% dei cicli. Due coppie ottennero la gravidanza, di cui una portata a termine e una ancora in corso al momento della pubblicazione.

Nel 1999, Windt (24) ottenne due gravidanze da ICSI effettuate con spermatozoi ottenuti da biopsie testicolari congelate e scongelate di due

pazienti azoospermici. In entrambi i casi, 2-5 biopsie di 2-3 mm³ furono prelevate e poste in 0.5 ml di medium di coltura (Medicult Sperm Preparation Medium). Il sopranatante fu esaminato per riscontrare la presenza di spermatozoi. L'omogenato contenente il tessuto testicolare fu diluito 1:1 con il crioprotettore (v/v; tuorlo d'uovo 1: glicerolo 2: tampone citrato 3) e centrifugato. La miscela fu posta in paillettes e congelata tramite un congelatore programmabile, utilizzando programma di congelamento controllato. Una singola paillette fu scongelata a 25°C per 15 minuti, il suo contenuto fu diluito lentamente con sperm preparation medium e centrifugato per 10 min a 350 g. Per isolare gli spermatozoi mobili, il pellet fu poi centrifugato in gradiente discontinuo di Percoll (90, 70, 50%). Lo strato al 95% fu infine risospeso in 100 µl di medium e incubato a 25°C fino al momento della ICSI. Furono recuperati 60 spermatozoi con motilità non progressiva (twitching) dopo 4 ore di incubazione.

Al-Hasani et al (25) ottennero spermatozoi da biopsie testicolari congelate e scongelate di 67 pazienti affetti da azospermia non ostruttiva. I campioni di tessuto, grandi 3-4 mm, furono posti in cryovials contenenti un medium tamponato con HEPES (SpermFreeze, Medicult). Tale medium era composto da Earle's balanced salt solution con il 0.4% di albumina serica umana e il 15% di glicerolo come crioprotettore. Il tessuto fu congelato per mezzo di un congelatore programmabile tramite vapori di azoto: la temperatura scese fino a -30°C in 5 minuti e fino a 150°C per i 55 minuti successivi. Il tessuto fu infine stoccato in azoto liquido. Il giorno del prelievo degli ovociti, un vial di tessuto testicolare congelato fu scongelato in un bagno di acqua a 37°C per 3 minuti. Il campione fu lavato due volte in medium di Ham F10 e tagliato in sottili pezzi tramite un bisturi chirurgico. Il terreno fu osservato al microscopio per rilevare la presenza di spermatozoi. Se non vi era traccia di spermatozoi veniva scongelato un altro vial per il recupero degli spermatozoi. Il supernatante venne poi incubato per 5 ore in Ham's F10 in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ a 37°C, messo in una Eppendorf da 2 ml e centrifugato a 500 g per 1 minuto. Il pellet fu poi risospeso con 3 microlitri di Ham's F10. Un'aliquota di 1 microlitro di questa sospensione venne poi trasferita in una piastra Petri contenente gocce di terreno e di PVP per la ICSI. Dopo la fertilizzazione, gli zigoti soprannumerari furono congelati. Dopo lo scongelamento, furono eseguiti 17 cicli di trasferimento di embrioni con un numero medio di embrioni di 2.7 e con uno score di embrioni cumulativo medio (CES) di 18.3 per transfer. Il tasso di gravidanza e di impianto per transfer in questi cicli (rispettivamente 23.5% e 8.3%) erano confrontabili con quelli raggiunti con gli embrioni freschi (35.7% e 12.7%), con un numero medio di embrioni di 2.7 e un CES medio di 28.7 per transfer.

La tecnica ottimale di congelamento di pezzi di tessuto testicolare, di sospensioni di cellule testicolari o di spermatozoi prelevati direttamente dal testicolo è probabilmente differente: infatti il glicerolo non è in grado di penetrare bene nel tessuto, anche se può comunque funzionare nel congelamento di spermatozoi e spermatidi in sospensioni di cellule testicolari. Probabilmente, per il congelamento di pezzi di tessuto testicolare intero le tecniche migliori prevedono quindi l'utilizzo di crioprotettori come il PROH, il DMSO o l'etilene glicole, che penetrano nel tessuto più efficacemente rispetto al glicerolo. Nel caso del congelamento dell'intero tessuto, indicato soprattutto per pazienti in età prepubere, l'obiettivo non è infatti quello di preservare spermatozoi maturi, ma quello di preservare gli spermatogoni: per questo è necessario utilizzare un crioprotettore che penetri abbondantemente il tessuto (26, 27).

Crabbe et al (28), compararono la motilità degli spermatozoi dopo crioconservazione di una sospensione di cellule prelevate da testicoli umani con quella di spermatozoi crioconservati in pezzi di tessuto testicolare

intero, con il glicerolo come crioprotettore. Gli spermatozoi congelati come sospensioni di cellule testicolari avevano una migliore motilità dopo lo scongelamento.

Sempre nel 1999, Gianaroli et al (29) sottoposero 64 pazienti azoospermici ad una biopsia testicolare investigativa combinata con la crioconservazione degli spermatozoi recuperati da un campione fresco esaminato contemporaneamente. La crioconservazione del tessuto testicolare fu eseguita nel 67% dei casi, in previsione di una successiva ICSI. I campioni testicolari prelevati furono posti in EBSS tamponato con HEPES, contenente il 6% di plasmanate, e lasciati riposare per 15 minuti a temperatura ambiente. Tali campioni furono poi tagliati in piccoli pezzettini sotto un microscopio. Una goccia di sospensione fu esaminata all'invertoscopia e qualora vi fosse stata presenza di spermatozoi la sospensione veniva posta in tubi Falcon da 5 ml e centrifugata a 600 g per 5 minuti. Il sopranatante fu poi rimosso, il pellet diluito in 1 ml di medium IVF e omogeneizzato usando una pipetta Pasteur. La crioconservazione fu eseguita secondo il protocollo di Mahadevan et al. (30): in breve, la soluzione di crioconservazione, Human Semen Preservation Medium (HSPM), fu aggiunta all'omogenato in uguale volume (1:1; 0.1 ml/min). Dopo un bilanciamento a 37°C per 5 minuti, l'omogenato fu caricato in paillettes da 0.25 ml, che furono prima esposte ai vapori di azoto per 15 minuti e poi stoccate in azoto liquido. Dopo il recupero degli ovociti, una paillette venne rimossa dall'azoto e scaldata immediatamente a 37°C. Per rimuovere il crioprotettore, l'omogenato scongelato fu lavato due volte in EBSS supplementato con il 6% di plasmanate, e centrifugato a 600 g per 5 minuti. Il pellet fu poi risospeso in 0.2 ml di medium IVF per la ICSI. In tutto, il tasso di fertilizzazione fu del 64% con spermatozoi maturi (139/218, 24 cicli), del 40% con round spermatids (2/5, 1 ciclo), e del 69% con elongated spermatids (9/13, 1 ciclo). Il tasso di clivaggio embrionale fu del 84%. Si ottennero 8 gravidanze (35% per paziente e 33% per transfer), con un tasso di impianto del 14.1%.

Nogueira et al (31) investigarono i cambiamenti morfologici causati dal congelamento e scongelamento di spermatozoi testicolari umani. Il recupero di biopsie testicolari fu eseguito in 6 pazienti con azospermia ostruttiva in previsione della ICSI. Furono eseguite analisi al microscopio ottico sulle cellule testicolari e analisi ultrastrutturali sugli spermatozoi e su spermatidi a diversi stadi prima e dopo la procedura di congelamento/scongelamento. Una volta prelevate, le biopsie testicolari (6-8 mm³) vennero poste in provette Falcon da 10 ml contenenti 3 ml di EBSS tamponato con HEPES e con il 0.5% di HSA. Ogni biopsia fu poi trasferita in un disco Petri e tagliata in pezzettini di uguali dimensioni, di cui uno fu destinato al congelamento mentre gli altri pezzi furono fissati per le analisi istologiche e ultrastrutturali. I pezzettini destinati ed essere congelati furono trasferiti in ampole contenenti 0.2 ml di EBSS tamponato con il 0.5% di HSA. Il medium contenente i campioni fu diluito 1:1 (v/v) aggiungendo, goccia a goccia, il medium di crioconservazione TEST-Yolk-Buffer contenente glicerolo al 12% (v/v). Il protocollo di congelamento fu eseguito tramite un congelatore programmabile (Planer): da temperatura ambiente a +5°C ad una velocità di -1°C/min, da +5°C a -80°C alla velocità di -10°C/min, da -80°C a -130°C ad una velocità di -25°C/min e infine stoccati in azoto liquido a -196°C. Al momento dello scongelamento, le ampole furono lasciate prima per 10 minuti a temperatura ambiente, e successivamente fu rimosso il crioprotettore mettendo i campioni in una provetta Falcon e aggiungendo goccia a goccia 10 ml di EBSS tamponato contenente lo 0.5% di HSA. Il sopranatante fu rimosso dopo centrifugazione a 750 g per 6 min. Le biopsie furono infine poste in un fissativo e processate per le analisi istologiche e ultrastrutturali. L'analisi istologica mostrò che

tutte le cellule germinali presentavano un aumento della vacuolizzazione citoplasmatica, con modificazioni del nucleo (restringimento e gonfiore) e della membrana plasmatica. Queste alterazioni strutturali si presentavano accentuate negli spermatoцитi I, che spesso mostravano disgregazione della membrana. Le analisi ultrastrutturali al microscopio elettronico mostrarono che, dopo congelamento e scongelamento, il danno maggiore era rappresentato dal rigonfiamento e dalla rottura delle membrane acrosomale e plasmatica interne ed esterne. Il materiale acrosomale spesso appariva disperso o con zone di condensazione. Danni simili si riscontrarono principalmente negli spermatoцитi e negli spermatoцитi a stadio avanzato. Gli autori conclusero che il congelamento e lo scongelamento di biopsie testicolari causano agli spermatoцитi gli stessi danni che il processo di congelamento provoca agli spermatoцитi eiaculati.

Jezek et al (32), nel 2001, analizzarono gli effetti del congelamento/scongelamento sulla morfologia del testicolo di ratto stoccato in diversi media di criopreservazione. Dopo il prelievo, le biopsie furono poste in un medium tamponato e addizionato con il 50% di siero di ratto e antibiotici, e lasciato in incubatore a 37°C (5% CO₂) per 1 ora. Successivamente, le biopsie furono trasferite in vials contenenti 0.5 ml di media di criopreservazione. Tutti i media di criopreservazione contenevano glicerolo e/o DMSO come crioprotettori.

I vials furono raffreddati a -60°C (Cryostation, Agar Scientific) in 5 minuti e poi esponenzialmente a -120°C nei seguenti 55 minuti. I vials vennero poi stoccati in azoto liquido. Dopo 2 mesi, i vial furono scongelati in un bagno d'acqua a 37°C per 3 minuti e immediatamente fissati in gluteraldeide per l'analisi ultrastrutturale. In generale, sia il glicerolo che il DMSO, quando utilizzati a concentrazioni moderate (6-25%) mostrarono di preservare la struttura dell'epitelio seminifero. La procedura di congelamento/scongelamento non ebbe un effetto significativo sul diametro tubulare; tuttavia, causò il ripiegamento della lamina propria e un notevole danno alle cellule del Sertoli, agli spermatoцитi e agli spermatoцитi. Spermatoцитi e spermatoцитi mostrarono occasionalmente danni nucleari, vacuolizzazione e rigonfiamento/restringimento del citoplasma. Comunque, la maggior parte di queste cellule mantennero la loro normale struttura in quasi tutti i cryomedia utilizzati. Recentemente, un protocollo simile a quello utilizzato per la crioconservazione dell'ovaio è stato applicato al testicolo umano e di topo, sia sottoforma di sospensioni di cellule che di fette di tessuto intero (Huhtanen, Siimes, Andersson, Hovatta, dati non pubblicati). Tale protocollo prevedeva l'utilizzo del PROH e del saccarosio come crioprotettori e il siero umano come supporto protei-

co. Sembra che questo protocollo mantenga una buona morfologia del tessuto testicolare dopo lo scongelamento. Nel testicolo di topo congelato in fette, i tubuli seminiferi apparivano quasi intatti, mentre nel testicolo umano tutti i tipi di cellule identificati nel tessuto sembravano essere sopravvissuti. La struttura dell'epitelio seminifero appariva leggermente disgregata, ma questo poteva essere dovuto ad una anomalia presente già nel tessuto fresco, oppure al processo di fissazione, che è spesso problematico nel tessuto testicolare umano. Le sospensioni di cellule testicolari sono state congelate, oltre che con il PROH e il saccarosio come crioprotettori, anche con glicerolo e DMSO sia con un protocollo di congelamento rapido che con un protocollo lento. I migliori risultati, in termini di sopravvivenza, si sono ottenuti utilizzando il protocollo di congelamento lento con PROH e saccarosio come crioprotettori. Tali risultati sono stati rivelati da un test di vitalità basato sull'attività esterasica. I tassi di sopravvivenza delle cellule testicolari, di topo e umane, erano del 65% e del 60%, mentre nel caso del DMSO (congelamento rapido) erano del 32% e del 10% rispettivamente.

Gli spermatoцитi testicolari o le sospensioni di cellule testicolari possono essere congelati utilizzando tecniche molto simili a quelle utilizzate nella crioconservazione del liquido seminale. Per quanto riguarda la crioconservazione del tessuto testicolare, la tecnica di congelamento lento è probabilmente la migliore.

Per salvaguardare la fertilità nei pazienti adulti le strade da seguire sono due: 1) crioconservare il liquido seminale e 2) crioconservare gli spermatoцитi estratti da biopsie di tessuto testicolare. Gli spermatoцитi crioconservati potranno poi essere utilizzati per la ICSI nei trattamenti di Fecondazione Assistita. Il congelamento degli spermatoцитi prelevati da tessuto testicolare ha una scarsa applicabilità nei pazienti pre-puberi in quanto nel tessuto sono presenti cellule immature. In questi pazienti il tessuto testicolare crioconservato potrebbe essere utilizzato per la maturazione in vitro degli spermatoцитi immaturi e per il reimpianto del tessuto stesso. Anche se il completamento della spermatogenesi in vitro appare per ora una possibilità remota, i recenti successi raggiunti nei roditori (33-35) sono molto incoraggianti.

Il reimpianto del tessuto testicolare crioconservato è un'altra tecnica utilizzabile per il ripristino della spermatogenesi. Nei roditori (36-39) questo è già possibile. Ulteriori studi sono necessari perché questa tecnica sia applicata anche nell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bernard A, Fuller BJ. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Hum Reprod Update* 1996; 2:193-207.
2. Baka SG, Toth TL, Veeck LL, et al. Evaluation of the spindle apparatus of in-vitro matured human oocytes following cryopreservation. *Hum Reprod* 1995; 1:1816-20.
3. Gook D, Osborn S, Johnston W. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2 propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum Reprod* 1995; 8:1101-9.
4. Bernard A, Imoedembe DA, Shaw RW, et al. Effects of cryoprotectants on human oocytes. *Lancet* 1985; i:632-8.
5. Hunter JE, Bernard A, Fuller B, et al. Fertilization and development of the human oocyte following exposure to cryoprotectants, low temperature and cryopreservation: a comparison of two techniques. *Hum Reprod* 1991; 6:1460-5.
6. Kazem R, Thompson LA, Srikantharajah A, et al. Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995; 10:2650-4.
7. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, et al. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997; 68:724-6.

8. Van Blerkom J, Davis PW. Cytogenetic, cellular and developmental consequences of cryopreservation of immature and human oocytes. *Microsc Res Tech* 1994; 27:165-93.
9. Hunter JE, Bernard A, Fuller BJ, et al. Measurements of the membrane water permeability (L_p) and its temperature dependence (activation energy) in human fresh and failed-to-fertilize oocytes and mouse oocyte. *Cryobiology* 1992; 29:240-8.
10. Hunter JE, Fuller BJ, Bernard A, et al. Vitriification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotectants; initial studies on fertilization and embryonic development. *Hum Reprod* 1995; 10:1184-41.
11. Gook D, Schiewe MC, Osborn S, et al. Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 1995; 10:2637-8.
12. Bernard A, Fuller BJ, Bentick B, et al. Investigation of the protective effects of propanediol during cryopreservation of mouse and human oocytes. *Hum Reprod* 1987; 2: 63-8.
13. Todorov I, Bernard AG, McGrath JJ, et al. Studies on 2,3-butanediol as a cryoprotectant for mouse oocytes: use of sucrose to avoid damage during exposure or removal. *Cryo-Lett* 1993; 14:37-9.
14. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977; 14:251-72.
15. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, et al. Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169:39-42.
16. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, et al. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod* 2001; 16:411-6.
17. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164:666-76.
18. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 1953; 172:767-8.
19. Sherman JF. Cryopreservation of human semen. In "Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility". Keel B, Webster BW. CRC Press Boca Raton Ann Arbor Boston, 1990: 229-60.
20. Behrman SJ, Sawada Y. Heterologous and homologous insemination with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fertil Steril* 1966; 17:457-66.
21. Cohen J, Garrisi GJ, Congedo-Ferrara TA, et al. Cryopreservation of single human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12:994-1001.
22. Allan JA, Cotman AS. A new method for freezing testicular biopsy sperm: three pregnancies with sperm extracted from cryopreserved sections of seminiferous tubule. *Fertil Steril* 1997; 68:741-4.
23. Oates RD, Mulhall J, Burgess C, et al. Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997; 12:734-9.
24. Windt ML, Coetzee K. Ongoing pregnancies resulting from intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of spermatozoa from frozen-thawed testicular biopsy specimens. *Andrologia* 1999; 31:169-72.
25. Al-Hasani S, Demirel LC, Schopper B, et al. Pregnancies achieved after frozen-thawed pronuclear oocytes obtained by intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular tissues from non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod* 1999; 14:2031-5.
26. Hovatta O. Cryopreservation of testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169:113-5.
27. Hovatta O. Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients. *Hum Reprod Update* 2001; 7:378-83.
28. Crabbe E, Verheven G, Tournave H, et al. Freezing of testicular tissue as a minced suspension preserves sperm quality better than whole-biopsy freezing when glycerol is used as cryoprotectant. *Int J Androl* 1999; 22:43-8.
29. Gianaroli L, Magli MC, Selman HA, et al. Diagnostic testicular biopsy and cryopreservation of testicular tissue as an alternative to repeated surgical openings in the treatment of azoospermic men. *Hum Reprod* 1999; 14:1034-8.
30. Mahadevan MM, Trounson AO, Leeton JF. Successful use of human semen cryobanking for in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983; 40:340-4.
31. Nogueira D, Bourgain C, Verheven G, et al. Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies. *Hum Reprod* 1999; 14:2041-9.
32. Jezek D, Schulze W, Kalanj-Bognar S, et al. Effects of various cryopreservation media and freezing-thawing on the morphology of rat testicular biopsies. *Andrologia* 2001; 33:368-78.
33. Schlatt S, Samuel Kim S, Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reprod* 2002; 124:339-46.
34. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. In vitro maturation of immature human male germ cells. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 166:45-50.
35. Carreau S. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 178:65-72.
36. Brinster RL, Nagano M. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. *Sem Cell Dev Biol* 1998; 9:401-09.
37. Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science* 2002; 296:2174-6.
38. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, et al. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testis. *Biol Reprod* 1999; 60:515-21.
39. Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, et al. Transplantation of male germ cell line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature Med* 2000; 6:29-34.