

# I BAMBINI CONCEPITI CON TECNICHE DI CRIOCONSERVAZIONE RIPRODUTTIVA

Eleonora Porcu, Maria Dirodi, Giuseppe Damiano, Antonia Bazzocchi,  
Stefano Venturoli

Centro di Sterilità e Procreazione Medicalmente Assistita Unità Operativa di Fisiopatologia della Riproduzione Umana  
Università di Bologna

*Indirizzo per corrispondenza:* Dott. ssa Eleonora Porcu

Centro di Sterilità e Procreazione Medicalmente Assistita Unità Operativa di Fisiopatologia della Riproduzione Umana  
Università di Bologna

Via Massarenti 13, 40138 Bologna (BO) Italia

tel: +39 051 6364596; fax: +39 051305806; e-mail: eleonora.porcu@unibo.it

## ABSTRACT

This review deals with cryopreservation which is one of the most stimulating aspects of the assisted reproduction technology (ART). The main advantages of this technique include storage for future use without repeating ovarian stimulation and chance of fertility for oncologic patients who are undergoing chemotherapy. The use of cryopreservation by many infertility and IVF centres determined a significant improvement of this technique and a greater interest for long-term effects too, in particular for newborns' health. The present review depicts the studies conducted in this direction.

The recent literature shows encouraging results regarding the safety of cryopreservation, although not all techniques have the same support of longitudinal studies. Today human sperm cryopreservation is a consolidated and safe procedure. An apparently normal development and growth of the few children born from frozen eggs was also reported by several studies but an international register and follow up is mandatory. Finally, children born after transfer of frozen-thawed embryos seem to be healthy according to the studies performed so far even though further investigations are needed. Cryopreservation of human embryos and gametes is a rapidly expanding field that contributes to increase IVF routine flexibility and offers an alternative to the patients at risk of losing their reproductive function due to antineoplastic treatments.

**Key words:** *oocyte cryopreservation, assisted reproduction, postnatal follow-up*

## RIASSUNTO

Questa review si occupa della crioconservazione per fini riproduttivi, che rappresenta uno degli aspetti più stimolanti della Riproduzione Medicalmente Assistita. Questa tecnica offre non solo l'opportunità di utilizzare in futuro gameti ed embrioni ottenuti da cicli di stimolazione ovarica precedenti, ma anche quella di procreare per pazienti neoplastici in attesa di chemioterapia. L'utilizzo della crioconservazione da parte di numerosi centri di PMA in tutto il mondo ha portato ad un netto perfezionamento della tecnica ma anche ad un crescente interesse nei confronti degli effetti a lungo termine della stessa, soprattutto per quello che riguarda la salute dei neonati. La presente review descrive gli studi condotti in questa direzione. Dalla recente letteratura si evincono risultati rassicuranti riguardanti la innocuità della crioconservazione, anche se non tutte le tecniche possiedono il medesimo supporto di osservazioni longitudinali. La crioconservazione degli spermatozoi è una procedura ormai consolidata, la cui sicurezza per la salute della prole è dimostrata da numerosi lavori. Anche gli ancora pochi bambini concepiti a partire da ovociti congelati hanno mostrato fino ad ora uno sviluppo ed una crescita apparentemente normali. Parimenti i bambini nati dal trasferimento di embrioni scongelati sembrano essere in buona salute sebbene, anche in questo caso, sia necessario ottenere maggiori dati con un follow up prolungato fino all'età adulta. Concludendo, la crioconservazione per fini riproduttivi rappresenta senza dubbio una metodologia che aumenta la flessibilità e l'efficienza globale della PMA offrendo parallelamente un'alternativa per i pazienti a rischio di perdita della funzione riproduttiva causata da trattamenti antineoplastici.

**Parole chiave:** *crioconservazione, Riproduzione Assistita, follow-up post-natale*

## INTRODUZIONE

La crioconservazione per fini riproduttivi ha assunto di recente, in tutto il mondo, una crescente importanza nei programmi di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) e con buona probabilità è destinata a giocare un ruolo significativo nei prossimi anni.

I principali vantaggi di questa tecnica includono: la conservazione di gameti ed embrioni per uso futuro, al fine di evitare la ripetizione della stimolazione ovarica; la possibilità di procreare per pazienti neoplastici

in attesa di chemioterapia; un minor rischio di gravidanze multiple, attraverso la riduzione del numero degli embrioni freschi trasferiti; una riduzione del rischio di sviluppare la sindrome da iperstimolazione ovarica che rappresenta ancora oggi la più seria complicanza dei regimi di superovulazione.

Da quando sono state descritte la prima gravidanza e la prima nascita ottenute da embrioni umani crioconservati (1, 2), sono stati sviluppati svariati metodi di crioconservazione, scongelamento e trasferimento degli embrioni; oggi il congelamento degli embrioni è divenuto di abituale

utilizzo in numerosi programmi di PMA in tutto il mondo.

Tuttavia, il dibattito sulla sicurezza della crioconservazione è ancora aperto e molti Autori hanno espresso le proprie perplessità su tale argomento, in particolar modo dopo un allarmante studio riguardante l'alterazione di morfologia e di sviluppo nei topi nati da embrioni congelati (3). Inoltre, molte mutazioni sono difficilmente valutabili, dal momento che possono determinare minimi effetti fenotipici nel rispetto della variabilità e dell'aspetto morfologico della progenie, ma pur tuttavia esse sono in grado di alterare le funzioni comportamentali e cognitive attraverso modificazioni biochimiche e microstrutturali.

Molti studi clinici sono rassicuranti anche se non tutte le tecniche hanno il medesimo supporto di osservazioni longitudinali.

### **Bambini concepiti da embrioni crioconservati**

La crioconservazione degli embrioni è stata utilizzata per la prima volta nei mammiferi nel 1972 (4) e nell'uomo agli inizi degli anni ottanta (5). La prima gravidanza ottenuta mediante embrioni scongelati risale al 1983 (1) e la prima nascita al 1984 (2).

Da allora le tecniche di crioconservazione sono evolute ed il trasferimento di embrioni congelati è utilizzato ampiamente in tutto il mondo, e ha determinato un consistente miglioramento dei risultati cumulativi della PMA.

Nel 1993 uno studio basato su 485 donne inserite in programmi di PMA, delle quali 124 erano state sottoposte a trasferimento di embrioni congelati (6), ha dimostrato un incremento del 5,2% nel tasso di nascita, del 13,2% in quello di gravidanze ottenute e dell'11,6% nel numero di feti vitali.

In un'altra casistica il tasso di gravidanze ottenute in 2707 coppie inserite in programmi di PMA è aumentato del 4% (7). Lo studio di altri Autori, con l'analisi di 610 pazienti sottoposte a 1000 cicli su fresco e 373 cicli su embrioni congelati, ha evidenziato un innalzamento pari al 6,6% nel tasso di gravidanze ottenute (8).

Nel 1998 è stato osservato un incremento dell'8% nelle nascite su 5032 cicli di crioconservazione embrionaria, con un tasso di nati vivi per transfer pari al 12% ed un incremento del 6% per embrione trasferito (9). Un altro studio ha valutato su scala mondiale più di 80000 embrioni congelati e più di 4000 gravidanze ottenute con embrioni crioconservati in tutto il 1995 (10).

Pertanto la crioconservazione degli embrioni umani rappresenta un settore di PMA non trascurabile e che richiede la massima attenzione da parte dei ricercatori allo scopo di garantire la sicurezza di questo procedimento.

### **Effetti della crioconservazione sull'impianto degli embrioni umani**

È necessario un confronto, a parità di qualità, fra il trasferimento di embrioni freschi e quello di embrioni congelati, per valutare l'affidabilità delle procedure di congelamento/scongelo.

La capacità di impianto degli embrioni umani scongelati è apparsa significativamente ridotta se confrontata con quella degli embrioni freschi (7,7% vs 24%) secondo uno studio eseguito nel 1990 (11).

Uno studio analogo (12) ha riportato un tasso di impianto del 12,6% per i cicli di trasferimento di embrioni freschi contro un tasso dell'8,1% per cicli di crioconservazione.

In un recente studio retrospettivo (13) è stato riportato un tasso di impianto dopo trasferimento di embrioni freschi significativamente più elevato rispetto a quello ottenuto con embrioni scongelati.

Fermo restando che la capacità d'impianto degli embrioni è intimamente legata alla loro abilità nel sopravvivere al processo di congelamento/scongelo, l'aspetto morfologico dell'embrione umano all'atto del

congelamento risulta un fattore fondamentale per il successivo impianto (14-16).

Un'analisi retrospettiva sull'impianto e sullo sviluppo in vivo degli embrioni scongelati (17) ha dimostrato un tasso di impianto dopo trasferimento di embrioni completi ed intatti (11,4%) più elevato rispetto a quello del trasferimento di embrioni incompleti e danneggiati (3,5%). Anche altri Autori hanno registrato un tasso di gravidanza più elevato dopo trasferimento di embrioni scongelati con blastomeri intatti rispetto a quello di embrioni nei quali non tutti i blastomeri risultavano intatti (16, 18, 19).

Una ragione di preoccupazione nasce dall'osservazione che, malgrado nel complesso il tasso di gravidanza risulti inferiore nei cicli di crioconservazione rispetto a quello dei cicli con embrioni freschi, il tasso di gravidanza multipla rimane significativo: 13% (9), 17% (20). Una spiegazione di questo risultato può essere trovata in una recettività endometriale leggermente più elevata in grado di compensare l'inferiore qualità degli embrioni scongelati (21, 22).

Numerosi studi suggeriscono che il metodo di inseminazione può interferire con il risultato della crioconservazione. Si ritiene che l'utilizzo dell' ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) consenta da un lato di ottenere tassi più alti di sopravvivenza post-scongelo e di impianto (23) ma che dall'altro lato determini un'incidenza di aborti pre-clinici più elevati, a causa dei danni inflitti alla, verificatisi nel corso dell'ICSI. Questi ultimi rendono l'embrione più sensibile ai cambiamenti chimico-fisici associati al processo di congelamento/scongelo (24, 25).

Secondo altri Autori, non sarebbero evidenziabili differenze di sopravvivenza post-scongelo, di impianto, di aborto e di gravidanza clinica tra i casi trattati con l'associazione di ICSI e crioconservazione e quelli gestiti con la inseminazione in vitro tradizionale e crioconservazione (25-30).

Il tipo di infertilità sembra essere correlato con il successo dell'impianto (20), mentre né il tipo di stimolazione ovarica (31, 32) né il tempo di crioconservazione (20, 33, 34) influenzano l'esito della crioconservazione. A questo proposito sono state descritte gravidanze a termine dopo il trasferimento di embrioni crioconservati per molti anni. Già nel 1999 veniva annunciata una gravidanza dopo 7,5 anni di crioconservazione embrionale in una donna di 44 anni (35). Inoltre, è stata descritta una gravidanza gemellare conclusasi con la nascita di due bambini sani dopo il trasferimento di embrioni crioconservati per 12 anni in una donna di 39 anni (36) e recentemente una gravidanza singola conclusasi con la nascita di un bambino sano dopo il trasferimento di embrioni crioconservati per ben 13 anni in una donna di 40 anni (37).

### **Malformazioni congenite, esiti ostetrici e perinatali**

I potenziali rischi di danneggiamento per gli embrioni crioconservati includono: esposizione ad agenti contaminanti nel microambiente biochimico, formazione di cristalli di ghiaccio all'interno dell'embrione, effetti tossici dei crioprotettori, danni da scongelamento, danni fisici in corso di manipolazione dell'embrione, danni al DNA conseguenti alla conservazione dell'embrione (38); il congelamento come tale non può essere considerato una procedura mutagenica. In passato numerosi studi hanno dimostrato come la crioconservazione embrionale sia correlata con un basso peso fetale (39) e con una maggiore frequenza di perdita fetale precoce post-impianto (39-44). Attualmente si ritiene che queste alterazioni potrebbero essere correlate all'elevata incidenza di gravidanze multiple nei cicli IVF, sebbene si sia osservato anche nelle gravidanze singole una peggiore perinatale rispetto alle gravidanze singole spontanee naturali (45, 46).

Nel 1989 è stato presentato il primo studio descrittivo a distanza di 2 anni su 50 gravidanze ottenute da trasferimento di embrioni scongelati

(47). Una gravidanza si è interrotta a 22 settimane di gestazione per una grave malformazione fetale, un parto è avvenuto prematuramente e nelle gravidanze singole si è riscontrata un'alta percentuale di presentazioni podaliche (12%).

Anomalie cromosomiche gravi, quali la trisomia del 13, 18 e 21, si sono riscontrate in feti e bambini concepiti da embrioni scongelati con una maggiore incidenza rispetto ai bambini concepiti spontaneamente, come riportato da ben due studi (48, 49); tali alterazioni non possono essere diagnosticate prima del trasferimento con semplice osservazione microscopica, così come gli embrioni portatori di aberrazioni non possono essere distinti su base morfologica da quelli con cariotipo normale.

In uno studio retrospettivo svolto nel 1994 (50) sono stati presi in considerazione 232 bambini concepiti tra il 1985 ed il 1991 mediante embrioni crioconservati ed un numero equivalente di bambini concepiti mediante cicli standard di IVF usato come gruppo di controllo. In entrambi i gruppi l'età media gestazionale, il peso alla nascita ed il tasso di mortalità perinatale risultarono simili e nel gruppo di bambini nati da embrioni congelati si riscontrò addirittura un minor numero di malformazioni gravi. In realtà, è possibile che questo ultimo dato sia dovuto all'effetto "filtrante" scaturito dal non considerare le gravidanze "chimiche" e gli aborti precocissimi come un segno di anomalie congenite.

Da uno studio osservazionale condotto nel 1995 (51) su 30 gravidanze ottenute da embrioni scongelati, si evinse che tutti i bambini presentavano un peso alla nascita superiore alla media (il peso del 45% dei bimbi nati da gravidanze singole era al di sopra del 75esimo percentile). Lo studio inoltre non riscontrò malformazioni gravi bensì solo due forme lievi (piede torto congenito e testicolo ritenuto), registrò un basso tasso di prematurità (4%) e un'alta percentuale di presentazioni podaliche (14%) anche nelle gravidanze singole.

Nello stesso anno tuttavia si riscontrarono alterazioni genetiche nei batteri e nelle cellule somatiche sottoposte a procedure di congelamento/scongelo (3).

In uno studio del 1995, un gruppo di 91 bambini (68 nati da gravidanze singole, 20 da gravidanze gemellari e 3 da una gravidanza multipla) concepiti da embrioni scongelati è stato confrontato con un gruppo di controllo costituito da 83 bambini concepiti spontaneamente tra il 1989 ed il 1994 (52). Nel gruppo di studio sono stati riscontrati una maggiore incidenza di complicanze perinatali quali lunghi periodi di ricovero in reparti di neonatologia e tre casi di malformazioni gravi.

Tuttavia, l'incidenza di malformazioni sia lievi che maggiori risultava simile nei due gruppi (31,9% vs 21,7% e 3,3% vs 2,4% rispettivamente) e il rischio relativo nel gruppo di bambini concepiti da embrioni scongelati rispetto a quello dei bambini concepiti spontaneamente risultava essere di 1,7 per le anomalie congenite di forma lieve e 1,4 per le anomalie congenite gravi. Le anomalie congenite lievi includevano nevi ed emangiomi in entrambi i gruppi, le anomalie congenite gravi comprendevano la Sindrome di Down, la Sindrome di Beckwith-Widemann e il rachitismo ipofosfatemico negli embrioni crioconservati, idronefrosi e gastroschisi nel gruppo di controllo.

Gli stessi risultati furono confermati nel 1996 da uno studio su 89 bambini nati dopo il trasferimento di embrioni scongelati (53). Questo studio mostrò un'elevata incidenza di gravidanze multiple e parti prematuri (14,7% per le gravidanze singole e 85,7% per le gravidanze gemellari), mentre il tasso di malformazioni (1,1%, un solo bimbo con uretere corto) era sovrapponibile con quello osservato nella popolazione generale, anche considerando i due aborti terapeutici avvenuti per Sindrome di Down e malformazioni multiple (3,4%).

Uno studio di coorte completo seguì, nel 1997, 270 gravidanze (163 singole, 98 gemellari e 9 trigemine) dal punto di vista sia ostetrico che neonatale (54). Il tasso di gravidanza per trasferimento embrionale era

del 21%, la frequenza di aborti spontanei del 23%, la frequenza di gravidanze ectopiche del 4%, la frequenza di parti multipli del 24,2% (22,8% gemellari e 1,4% trigemini); l'incidenza di parti prematuri era del 5,6% per i singoli, del 44,9% per i gemellari e del 100% per i trigemini, l'incidenza di malformazioni gravi era del 2,7% e si verificò una mortalità perinatale dell'8%. Il confronto con il gruppo di controllo (bambini concepiti da cicli standard di IVF e spontaneamente) evidenziò differenze non significate in termini di tasso di gravidanza, di parto e outcome perinatale; le uniche differenze evidenti erano costituite da un peso medio alla nascita significativamente più basso ed una maggiore incidenza di tagli cesarei nel gruppo IVF a dispetto del gruppo dei concepiti spontaneamente.

Gli stessi risultati furono confermati da uno studio condotto lo stesso anno da Wood (55).

Uno studio realizzato nel 1998 confrontò per età materna, parità, gravidanza singola o gemellare e data del parto 255 bambini concepiti da embrioni crioconservati, 255 bambini concepiti da embrioni freschi e 252 bambini concepiti spontaneamente (56). Il più importante risultato di questo studio riguardò l'accrescimento, che evidenziò nei 3 gruppi caratteristiche di crescita simili e per le gravidanze singole e per quelle gemellari. La frequenza di gravi malformazioni fu 2,4% per il primo gruppo, 3,5% per il secondo e 3,2% per il terzo.

Nel 1999 il Registro Nazionale Svedese IVF condusse uno studio di coorte che riportò nei cicli con trasferimento di embrioni congelati a confronto con cicli da embrioni freschi un più basso peso alla nascita ed una minore incidenza di parti pretermine; inoltre evidenziò nei bimbi concepiti da IVF confrontati con la popolazione generale un rischio venti volte più elevato di gravidanze multiple (ad elevato rischio di nascite premature) e di basso peso alla nascita (57).

Attualmente è difficile distinguere gli effetti genotossici e teratogeni che sono causati dalle tecniche di congelamento/scongelo da quelli causati dall'esposizione alle sostanze tossiche: per esempio, nel topo l'esposizione pre-impianto agli ioni di ammonio è stata collegata ad uno sviluppo ritardato del feto e a difetti del tubo neurale (58), mentre nell'agnello il peso alla nascita può essere influenzato dal contesto e dal microambiente in cui gli embrioni sono coltivati (59); è pertanto chiaro che il ritrovamento nelle soluzioni crioconservative di un agente chimico citotossico e mutagenico come la formaldeide (60, 61) possa essere considerato un motivo di preoccupazione molto serio. Anche il metodo ICSI è stato associato a potenziale causa di disordini funzionali, malgrado possano essere coinvolti fattori ereditari (62, 63). È quindi importante non confondere queste alterazioni con quelle causate dalla crioconservazione.

In conclusione, non esiste attualmente una evidenza scientifica sufficiente a supportare l'ipotesi di un impatto negativo della crioconservazione degli embrioni sui risultati ostetrici e sulle malformazioni congenite ma va tenuto presente che l'efficacia della maggior parte degli studi nell'individuare differenze nel tasso di malformazioni è molto bassa.

### **L'aneuploidia come conseguenza della crioconservazione degli embrioni**

Sebbene non esistano evidenze che la crioconservazione degli embrioni aumenti la frequenza di difetti alla nascita, essendo l'incidenza di anomalie cromosomiche, quale la sindrome di Down, e di malformazioni congenite lievi simile a quella riscontrata in cicli standard di IVF, è possibile che alterazioni cromosomiche anche più gravi, come l'aneuploidia, derivino da metodi di crioconservazione e che queste non siano clinicamente evidenti in quanto causa di mancato attecchimento o aborto precocissimo.

L'incidenza della tetraploidia in tessuti umani abortivi e nei bambini nati concepiti spontaneamente è compreso tra 4% e 8% (64, 65) ed è

probabilmente dovuta a duplicazione genomica in assenza di precedente divisione mitotica (64); al contrario, negli embrioni congelati/scongelati il principale meccanismo generante l'aneuploidia sembra essere la fusione spontanea dei blastomeri.

La fragilità degli embrioni in stadio iniziale e la loro sensibilità a molti fattori esogeni quali virus, polietilenglicole o campi elettrici, è ben conosciuta (66, 67); pertanto, è facile supporre che anche il processo di congelamento-scongelamento possa determinare danno cellulare, in particolar modo nelle fasi iniziali dello sviluppo embrionale. Rotture nella zona pellucida e danni alla membrana cellulare o ai componenti intracellulari sono stati indicati in molti studi come conseguenza della crioconservazione (68, 69).

Il primo studio sulla fusione cellulare dei blastomeri come causa di aneuploidia cellulare è stato condotto nel 1984 (70) e non mostrò differenze tra i vari crioprotettori utilizzati nel generare danno cellulare (eccetto il glicerolo subito abbandonato a causa della sua alta pericolosità); invece attribuì maggiore importanza ad una bassa qualità embrionale.

Tuttavia, l'utilizzo del propandiole come crioprotettore è stato correlato con la formazione di cellule poliploidi attraverso il meccanismo di fusione spontanea dei blastomeri, come rilevato da uno studio condotto nel 1991 (71) mentre metodi di congelamento rapido (vittrificazione) potrebbero causare un aumento dei crossing over mitotici (72, 73) e dei danni cromosomici (74).

I crioprotettori contribuiscono probabilmente a determinare la fusione spontanea dei blastomeri causando la disidratazione cellulare e il rigonfiamento osmotico; i ponti citoplasmatici potrebbero essere l'altro importante fattore ad indurre il processo di fusione, ma non vengono mai individuati all'esame mediante microscopio elettronico degli embrioni umani in fase iniziale (75, 76).

Uno studio sull'aneuploidia e sul mosaicismo dei cromosomi X,Y e 1 in embrioni umani congelati nel giorno secondo e terzo del loro sviluppo fu condotto nel 1998 mediante FISH (ibridazione in situ) ed evidenziò che il 57% degli embrioni scongelati che presentavano arresto della divisione nel corso delle prime 24 ore presentavano anomalie cromosomiche (77). Nel 2000, uno studio evidenziò la presenza di fusione spontanea dei blastomeri, generante poliploidia e mosaicismo cromosomico, in un gruppo di 1141 embrioni congelati al giorno 2 e 873 embrioni congelati al giorno 3 mediante la tecnica standard con propandiole (78). Il processo di fusione fu osservato con una frequenza del 4,6% nel primo gruppo (giorno 2) e del 1,5% nel secondo (giorno 3), ciò implica che gli embrioni umani in fase precoce di sviluppo sono più suscettibili al crio-danno rispetto agli embrioni più vecchi, poiché la fluidità ed altre proprietà della membrana cellulare cambiano durante lo sviluppo cellulare. La fusione di due o più blastomeri comporta la formazione di cellule ibride multinucleate, chiaro segnale di alterazione della ploidia, e di embrioni o interamente poliploidi (tetraploidi, esaploidi o con aberrazioni più complesse) o mosaici con cellule poliploidi e normali. I cambiamenti del numero dei cromosomi negli embrioni umani scongelati fu dimostrato nei mosaici utilizzando la FISH con sonde di DNA caratterizzanti sequenze univoche sui cromosomi 9, 15, 17 e 22, che indicò la presenza di segnali di fluorescenza sia tetraploidi che diploidi nei nuclei interfasci. Fra gli embrioni alterati quelli interamente poliploidi (16%) furono meno frequenti dei mosaici (84%). Inoltre il 70% degli embrioni alterati risultava essere morfologicamente buono, a differenza di quello riportato dai precedenti studi.

La possibilità di sviluppo di embrioni alterati dalla fusione non è chiaro. In tale studio il 7% di questi embrioni lasciati in condizioni di coltura sub-ottimali raggiunse lo stadio di blastocisti, il 56% si divisero ed il 37% arrestò completamente il suo sviluppo. 15 mosaici morfologicamente normali furono trasferiti portando a 2 aborti spontanei ed una gravidanza

chimica. Pertanto è altamente probabile che gli embrioni portatori di fusione siano eliminati o prima dell'impianto o attraverso un aborto precocissimo. Tuttavia è possibile che i meccanismi di riparazione correggano gli errori embrionali o che le cellule alterate siano sequestrate dal trofoblasto e successivamente dalla placenta, dal momento che cellule poliploidi sono spesso rinvenute in questi tessuti extra embrionali (79).

Fu riportato solo un caso di gravidanza gemellare con due sacchi vuoti tetraploidi dopo il trasferimento di zigoti congelati-scongelati (80) ma embrioni di tipo tetraploidi si rivelarono capaci di sviluppo avanzato post impianto e con la possibilità di proseguire (81).

Concludendo, è possibile ammettere che la crioconservazione possa causare danno cellulare portando alla aneuploidia ma allo stato attuale le implicazioni cliniche di tali eventi non sembrano essere rilevanti; dovranno essere condotti altri studi in questa direzione.

### **Effetti a lungo termine della crioconservazione degli embrioni: follow-up postnatale**

Fino ad ora pochi studi si sono focalizzati sugli effetti a lungo termine della crioconservazione degli embrioni, così parametri clinici appropriati sono difficili da trovare, da valutare e possono essere facilmente influenzati dall'ambiente o da altri fattori. Inoltre, un follow-up a breve termine potrebbe diventare un elemento di disturbo nella vita di questi bambini e, infine, potrebbe essere accettato con difficoltà dai loro genitori, che spesso vogliono mantenere segreta l'origine del concepimento.

Nei bambini nati da gravidanze gemellari e trigemine a fronte di quelli nati da gravidanze singole è stato riscontrato un incremento dell'incidenza di: ritardo psicomotorio e del linguaggio, disabilità mentale e di sviluppo, paralisi cerebrale, ritardo mentale, deficit sensoriali, difficoltà di apprendimento, problemi di attenzione e di comportamento (82).

Nel 1995 fu condotto uno studio dedicato al periodo successivo quello postnatale; un primo campione di 92 bambini nati a seguito dello scongelamento di embrioni fu confrontato con un secondo di 83 bambini concepiti spontaneamente. Si concluse che il QI complessivo, assegnato con la scala di Griffith, era più alto nel gruppo sperimentale ma questo era probabilmente dovuto alla classe sociale leggermente più alta dei loro genitori; dopo l'analisi dei livelli della scala di Griffith nel primo campione fu trovata una significativamente inferiore capacità di ascolto e di conversazione (38).

Nel 1996 fu condotto uno studio di coorte senza campione di controllo su 89 bambini di età compresa tra 1 e 9 anni (53). Tutti i bambini studiati, eccetto 3 di età compresa fra 1 e 2 anni, risultarono normali in termini di altezza e peso, anche quelli nati prematuri. La frequenza di patologie croniche risultò di scarso interesse statistico. Solo il 7,9% dei bambini ricevette temporaneamente supporto psicologico, 5 di questi ebbero difficoltà nell'apprendimento e 2 disturbi del sonno. Nei bambini di età inferiore a 5 anni non fu trovata alcuna caratteristica patologica a carico delle abilità psicomotorie, e solamente uno (nato prematuro) presentò ritardo psicomotorio. Nei bambini oltre i 5 anni fu rilevata una intelligenza normale, basandosi su valutazioni retrospettive del successo scolastico: solamente uno presentò difficoltà di apprendimento mentre il 24,4% era in anticipo di 1 anno o tra i migliori della classe.

Uno studio realizzato nel 1998 confrontò per età materna, parità, gravidanza singola o gemellare e data del parto 255 bambini concepiti da embrioni crioconservati, 255 bambini concepiti da embrioni freschi e 252 bambini concepiti spontaneamente (56). Il più importante risultato di questo studio riguardò l'accrescimento, il secondo le malformazioni gravi, le malattie croniche, l'incidenza cumulativa delle malattie comuni, lo sviluppo durante i primi 18 mesi. La frequenza dei disagi cronici all'età di 18 mesi nel campione dei bambini nati da embrioni crioconservati era del 17%; una frequenza leggermente più alta, sempre nello stesso

campione comparato con il campione standard-IVF e quello dei concepiti spontaneamente, fu trovata per i disturbi neurologici (1,2% vs 0% vs 0%), per le allergie alimentari (4,3% vs 2,4% vs 2,8%) e per l'intolleranza al lattosio (1,6% vs 0,4% vs 0,8%).

Relativamente alle malattie comuni non fu trovata alcuna differenza significativa nei 3 gruppi. Le conclusioni furono che la crioconservazione non influiva negativamente sull'accrescimento e non sembrava causare handicaps minori, disturbi comportamentali, difficoltà di apprendimento, disfunzioni nella percezione e capacità di attenzione; tuttavia, sebbene il livello di dettaglio di questo studio è stato sufficientemente alto per gli obiettivi finali, probabilmente i disturbi cognitivi minimi non potevano essere rilevati in bambini così piccoli.

In conclusione, i bambini nati dal trasferimento di embrioni scongelati sembrano essere in buona salute, ma gli studi realizzati fino a questo momento sono pochi e con casistiche limitate e pertanto, ad oggi, non si possono delineare informazioni definitive.

### **Bambini concepiti da zigoti e blastocisti crioconservati Risultati clinici di zigoti umani crioconservati**

Convenzionalmente gli embrioni congelati comprendono embrioni multicellulari, che nella maggior parte degli studi resistevano senza danni al processo di crioconservazione e scongelamento.

Tuttavia recenti studi si sono focalizzati sulla crioconservazione di embrioni in stadi precoci come gli zigoti, prima o dopo la fusione dei pronuclei (embrioni pronucleari e zigoti singamici rispettivamente), anche se l'attuale tendenza è di congelare o embrioni multicellulari, più resistenti alla crioconservazione, od ovociti.

Il problema più importante riguardante il congelamento di embrioni in stadio precoce è la loro fragilità in questa fase di sviluppo. Come già menzionato, gli embrioni hanno mostrato una particolare sensibilità ai principali fattori esogeni come virus, polietilenglicole o campi elettrici (66, 67); così come il processo di congelamento-scongelamento si suppone possa determinare un danno alla cellula, in particolare agli embrioni nella prima fase di sviluppo. In molti studi sono state osservate, come conseguenza del processo di crioconservazione, lacerazioni nella zona pellucida e lesioni della membrana cellulare o dei componenti intracellulari (68, 69).

Il danno alla zona pellucida provocato dall'inseminazione mediante ICSI è stato considerato un importante fattore addizionale di rischio per il danneggiamento da crioconservazione degli embrioni concepiti mediante tale tecnica.

La crioconservazione degli embrioni pronucleari (o di ovociti 2 PN) è risultata essere un metodo efficace per l'utilizzo di embrioni sovrannumerari, essendo una tecnica molto semplice ed implicando meno problemi etici rispetto al convenzionale congelamento degli embrioni multicellulari o degli zigoti singamici, in cui l'identità genetica viene già formata dalla fusione dei pronuclei. Inoltre, due studi indicarono che l'età degli zigoti al momento del congelamento era un parametro fondamentale nel determinare il successo dell'impianto dopo lo scongelamento, e che il tasso di impianto ottimale era ottenuto con zigoti congelati al momento dell'avvenuto completamento della migrazione pronucleare (20-22 ore dopo l'inseminazione) prima della fusione dei pronuclei dal momento che, raggiungendo la singamia, gli zigoti ottenuti mediante IVF e poi congelati perdono gradualmente la loro capacità di impianto (83, 84).

Non è tuttavia ancora chiaro il momento migliore per il congelamento degli zigoti concepiti mediante ICSI. Uno studio realizzato nel 1997 (27) confrontò 39 embrioni derivanti da ICSI con 60 embrioni derivanti da IVF standard che erano stati crioconservati nella fase pronucleare. Lo studio non evidenziò differenze significative fra i 2 gruppi in termini

di tasso di sopravvivenza (93,2% vs 94,8%) e tasso di gravidanza (14% vs 17,4%).

Risultati simili furono ottenuti da uno studio precedente (1996) che confrontò embrioni concepiti mediante ICSI con embrioni concepiti mediante IVF standard congelati in fase pronucleare (85).

Attualmente, i pronuclei degli ovociti fecondati mediante ICSI appaiono precocemente rispetto a quelli ottenuti mediante IVF standard (dato che gli ovociti sono attivati velocemente dopo l'inseminazione diretta di spermatozoo nel citoplasma), così l'avvio della singamia stessa (segnata dalla scomparsa del o dei pronuclei) avviene anticipatamente. Questo suggerisce la necessità di accorciare nei cicli ICSI l'intervallo tra inseminazione e congelamento. Cosa peraltro confermata da uno studio di coorte condotto nel 1998 (28) che confrontò i tassi di sopravvivenza, di impianto e di perdita embrionale di zigoti umani congelati ottenuti mediante ICSI con zigoti umani congelati ottenuti mediante IVF standard. I tassi di sopravvivenza risultarono simili nei due gruppi (87,7% vs 89,1%), mentre furono trovati a seguito del trasferimento di zigoti ICSI congelati/scongelati un più basso tasso di impianto (10,9% vs 25%) e un più alto tasso di aborti (57,1% vs 11,8%). In questo studio, il momento del congelamento dello zigote (dopo la fusione dei pronuclei nel gruppo ICSI) fu ritenuta la principale spiegazione per la più bassa capacità di impianto degli zigoti ICSI congelati/scongelati.

Allo stesso modo del congelamento convenzionale di embrioni, la durata della crioconservazione non sembra influire negativamente sullo sviluppo e il potenziale impianto di zigoti congelati. Sono state riportate nascite di bambini vivi ottenute mediante il trasferimento di zigoti crioconservati fino ad otto anni (86).

Pertanto la crioconservazione di embrioni in stadio iniziale di sviluppo può essere considerata una valida alternativa alla crioconservazione convenzionale di embrioni sia nei cicli ICSI che in quelli IVF standard.

### **Bambini concepiti da blastocisti crioconservate**

Esiste parziale accordo circa lo stadio di sviluppo ottimale in cui iniziare la crioconservazione di embrioni umani (87, 88). Un dibattito parallelo riguarda il momento migliore per il trasferimento di embrioni umani freschi. Congruentemente a quanto riportato da alcuni Autori (89, 90) secondo cui trasferimenti di embrioni freschi al giorno 5 avevano un maggiore tasso di impianto confrontati con quelli al giorno 6 (anche se i moderni terreni di coltura consentono l'accrescimento in vitro di blastocisti umane), il trasferimento di embrioni freschi più vecchi di 6 giorni è inusuale. Un recente lavoro riguardante dei bambini nati vivi a seguito del trasferimento di blastocisti fresche al giorno 7 (91) ha aumentato l'incertezza sul momento di trasferimento migliore sia degli embrioni freschi che di quelli congelati.

Il principale vantaggio di trasferire blastocisti umane è il loro apparente elevato potenziale di impianto, dovuto al loro avanzato stadio di sviluppo ed alla loro resistenza al processo di congelamento-scongelamento. Attualmente, le blastocisti umane sembrano affrontare meglio il processo di congelamento-scongelamento, ma il loro tasso di accrescimento in vitro risulta non prevedibile (92) sebbene esista una relazione fra il grado di evoluzione delle blastocisti ed i risultati riproduttivi (89).

### **Bambini concepiti da ovociti crioconservati**

La crioconservazione di ovociti non fertilizzati presenta maggiori problemi tecnici rispetto a quella di embrioni in fase iniziale di sviluppo, ma ha il vantaggio di minori implicazioni etiche e legali. Inoltre consente alle donne di preservare la fertilità a seguito di malattie pelviche, chirurgia, radio/chemioterapia responsabili di danno ovarico (93).

Una prole normale e vivente fu ottenuta sia nel topo che nel coniglio

dopo crioconservazione degli ovociti (94).

E' noto che gli ovociti sono particolarmente vulnerabili alla bassa temperatura.

Le principali alterazioni inflitte agli ovociti dal processo di congelamento comprendono possibili alterazioni alla zona pellucida, che potrebbe diventare più dura, riducendo il tasso di fertilizzazione (69, 95, 96); possibili alterazioni ai granuli corticali, che potrebbero essere rilasciati prematuramente, incrementando il rischio di polispermia (97); possibili alterazioni al fuso meiotico, che potrebbero incrementare il rischio di aneuploidia (98-100); alterazioni agli organuli citoplasmatici causate dalla formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari (101); alterazioni del volume ovocitario causato dalle differenze di pressione osmotica tra le soluzioni intra ed extracellulari (102).

Il rischio più allarmante relativo alla crioconservazione degli ovociti è quello ipotetico di aneuploidia negli embrioni concepiti con questo metodo.

Infatti, il fuso meiotico degli ovociti depolimerizza a bassa temperatura, e, anche se ha luogo una ripolimerizzazione dopo riscaldamento, anomalie genetiche conducenti ad embrioni aneuploidi potrebbero verificarsi quando l'ovocita, bloccato in metafase della seconda divisione meiotica (stadio MII), completa la sua divisione al momento della fertilizzazione (103). L'entità del disassemblaggio del fuso dipende dal livello di decremento della temperatura e dalla sua durata e gli stessi crioconservatori possono aumentare le alterazioni della struttura del fuso (104).

L'incidenza di aneuploidia negli embrioni di topo ottenuti da cicli IVF è simile in diversi studi (105, 2%; 106, 8,3%; 107, 5,4%) e non è correlato alla dose di gonadotropine utilizzata per indurre la superovulazione (105). Tuttavia, la dose di gonadotropine utilizzata è correlata, tanto quanto la concentrazione spermatica, con la poliploidia risultante dalla fertilizzazione polispermatica o dalla ritenzione del secondo globulo polare dopo crioconservazione (108).

Glenister (109) documentò che l'incidenza nel topo di aneuploidia dopo crioconservazione degli ovociti era più bassa rispetto ai controlli (1,5%) mentre la poliploidia era due volte più alta (15,8%).

Un altro studio condotto l'anno successivo (110) trovò nel topo una più alta incidenza di aneuploidia dopo congelamento di ovociti rispetto ai controlli (32% vs 12%), anche se non furono osservati feti impiantati malformati.

Risultati simili furono trovati da Carrol (111): fu trovata una più alta incidenza di poliploidia dal conteggio dei pronuclei negli ovociti congelati confrontati con i controlli. Tuttavia, il metodo del conteggio dei pronuclei per identificare la poliploidia non è sempre affidabile, come rilevato da Plachot (112) secondo cui il 25% degli embrioni con 3 pronuclei risultava essere diploide o aploide.

Uno studio condotto nel 1992 analizzò il corredo cromosomico di embrioni di topo derivanti da ovociti scongelati alla prima divisione, comparando questi con embrioni di controllo derivati da ovociti freschi, con l'obiettivo di valutare gli effetti della crioconservazione mediante 'congelamento lento' - 'scongelo rapido' sul numero dei cromosomi (113). Rispetto ai freschi, pochi ovociti scongelati si divisero dopo IVF fino allo stadio di 2 cellule (34,1% vs 75%); l'incidenza di iperplodia era più alta nel gruppo di studio rispetto a quello di controllo (4,5% vs 0%) ma l'incidenza di poliploidia era più bassa (17% vs 26,2%).

Un importante fattore nell'analisi dei rischi di aneuploidia è rappresentato dall'età materna, compatibilmente col fatto che il fuso meiotico è frequentemente alterato nelle donne di 40 anni (114) e che un maggior numero di non-disgiunzioni e predivisioni dei cromatidi sono riscontrati in queste donne (115).

Gli effetti dei crioprotettori sul fuso meiotico degli ovociti è stato studiato da molti Autori. Nel 1987 l'esposizione di ovociti non fertilizzati al DMSO è stato messo in relazione alla depolimerizzazione del fuso (116). Si è stabilito che la presenza di 1,2-propandiolo dopo il riscaldamento ostacola il ritorno alla normalità dei fusi, anche se non mostra effetti sulla fertilizzazione (117). Un altro studio eseguito nel 1998 (118) evidenziò che il raffreddamento a 0° C in presenza di DMSO non portava ad una stabilizzazione del fuso.

Altri studi esposero risultati contrastanti. Nel 1993 l'utilizzo di propandiolo come crioconservatore permise al 64% degli ovociti MII di sopravvivere al processo di 'congelamento lento - scongelamento rapido', con fuso meiotico normale e nessuna presenza di aneuploidia associata al congelamento (119). Nel 1994 risultati simili furono ottenuti comparando 182 ovociti MII crioconservati con 268 ovociti di controllo: il tasso di sopravvivenza utilizzando un protocollo di congelamento rapido con propandiolo-saccarosio come crioconservatori fu del 65% e non si osservò alcun incremento di anomalie del cariotipo negli ovociti crioconservati (97). In molti si focalizzarono sugli effetti della temperatura ambiente sugli ovociti freschi.

Pickering et al., (98) trovarono che su 52 ovociti freschi recuperati e analizzati mediante immuno-citochimica, il 50% era alterato dopo 10 minuti di esposizione a temperatura ambiente a dispetto dell'8% negli ovociti di controllo: il 100% degli ovociti esposti 30 minuti a temperatura ambiente risultarono distrutti; infine il ritorno a 37 °C per 1 o 4 ore ristabilì una morfologia normale solo nel 28% degli ovociti con evidenza di dispersioni cromosomiche nell'11% degli ovociti.

Almeida e Bolton (120) dimostrarono che aberrazioni identiche venivano ottenute dall'esposizione degli ovociti a 32°C o 25°C. Negli ovociti congelati il 77-89% dei fusi mostrava anomalie a dispetto del 69% mostrato dal campione di controllo e, relativamente alla dispersione cromosomica, il 50% a fronte del 13%.

D'altro parte, anche lo stesso raffreddamento a 0°C può causare danni al fuso meiotico.

Nel 2001 uno studio condotto su 55 ovociti maturati in vitro (121) mostrò che i danni al fuso nello stadio di metafase II sono tempo-dipendenti: minimi dopo 1 minuto, completamente scomparsi dopo 10 minuti.

La vitrificazione fu introdotta per la prima volta con l'obiettivo di evitare danni da cristallizzazione attraverso la totale eliminazione della formazione di cristalli di ghiaccio, sia intra che extracellulari. Un altro vantaggio di questo metodo è la facilità di esecuzione: essa è basata su un diretto contatto tra la soluzione di vitrificazione contenente crioconservanti e l'azoto liquido (122). Tuttavia, nella maggior parte dei Centri vengono ancora preferite le tecniche convenzionali di crioconservazione degli ovociti, in accordo con gli studi precedenti secondo cui la vitrificazione potrebbe aumentare il rischio di aneuploidia (123) e con la carenza di studi recenti su questo argomento.

La crioconservazione di ovociti immaturi in profase I (stadio GV) è anche stata proposta come alternativa alla crioconservazione standard degli ovociti, essendo stato osservato che questi ovociti erano meno sensibili al danno criogenico, compatibilmente alla mancanza del fuso e alla differente permeabilità di membrana (124, 125, 9).

Allo stato attuale non sembra ci siano vantaggi dalla crioconservazione di ovociti immaturi in termini di tasso di sopravvivenza, tasso di fertilizzazione e capacità di sviluppo. Inoltre, questo metodo richiede una maturazione degli ovociti in vitro dopo lo scongelamento ed è stato associato ad una aumentata incidenza di aberrazioni cromosomiche. Uno studio condotto nel 1997 (126) che comparò 128 ovociti immaturi congelati con 91 ovociti di controllo, mostrò un aumentata frequenza di anomalie cromosomiche (77,8% vs 31,8%) e di anomalie del fuso

(70% vs 22,2%); tali percentuali erano simili (79% vs 22% di anomalie del fuso) in altri studi più recenti (127). Al contrario, altri Autori non trovarono differenze in termini di anomalie del fuso fra ovociti crioconservati in stadio MII e in stadio GV (128; 129). Tuttavia, ad oggi, è stata riportata la nascita di un solo bambino concepito a partire da ovociti crioconservati in stadio precoce maturati in vitro e fertilizzati mediante ICSI (130).

Concludendo, possiamo assumere che la crioconservazione possa determinare un danno al fuso meiotico degli ovociti, anche se la situazione più pericolosa sembra essere quella di manipolare inappropriatamente gli ovociti umani MII a temperatura ambiente. Recenti sviluppi, specialmente riguardanti l'utilizzo di crioprotettori permettono di ottenere un maggior tasso di sopravvivenza e di fertilizzazione con ovociti scongelati.

Nell'uomo le prime gravidanze e i primi nati vivi furono annunciati nel 1986-88 (131-133). Apparentemente, questi bambini erano normali ed in buona salute. Chen (131) ottenne tale risultato mediante una tecnica che comprendeva una riduzione di dimensione del complesso ovocita/cumulo-oofo, l'aggiunta di dimetilsolfossido (DMSO) come primo stadio della procedura, raffreddamento lento tra i -7°C ed i -36°C dopo sedimentazione ed un rapido congelamento fino a -196 °C prima del conservazione in azoto liquido. Lo scongelamento fu effettuato rapidamente mediante riscaldamento con immersione in acqua a 37 °C, seguito da diluizione dei crioconservanti in un unico stadio. Gli ovociti furono esaminati per le evidenze morfologiche di sopravvivenza. Il successivo sviluppo di questi gameti richiese il trasferimento su terreni di coltura regolari, e dopo il tempo appropriato furono prelevati per l'inseminazione.

Van Uem (133) ottenne la seconda nascita riportata in letteratura dopo crioconservazione degli ovociti mediante una tecnica di congelamento differente da quella descritta da Chen. Nel tentativo di superare il danno cellulare dovuto al super-raffreddamento, egli ideò un sistema di raffreddamento 'open-vessel' (contenitore aperto) con controllo computerizzato (CTE 8100). Questo sistema permette al 'seeding' di avere luogo automaticamente ad un range di temperatura ideale attorno al punto di congelamento del mezzo (auto-seeding). Poi, Van Uem adottò la tecnica del 'congelamento lento - scongelamento lento'. Allo stesso modo di Chen, anche van Uem ridusse il cumulo ooforo, ma utilizzò come mezzo di raffreddamento una soluzione salina tamponata con fosfato contenente siero di cordone fetale al 10% inattivato al calore e 1,5 mol/l DMSO non raffreddato prima dell'aggiunta agli ovociti.

Successivamente, solo dopo parecchi anni fu riportato un'altra nascita di una bambina sana concepita mediante crioconservazione di ovociti umani (134). Questo fu il primo bambino nato a seguito di ICSI con ovociti crioconservati mediante tecnica del congelamento lento con propandiolo. La ICSI parve essere una scelta vincente per l'inseminazione di ovociti crioconservati poiché furono velocemente ottenute ulteriori gravidanze dallo stesso team (135-143) e da altri gruppi che adottarono la stessa tecnica (144-151). Nello stesso periodo e con la stessa tecnica Tucker e coll. (130) ottennero la prima nascita di un bambino sano derivante da vescicole germinali crioconservate. L'anno seguente, Kuleshova (152) annunciò la nascita del primo bambino derivante da ovociti conservati con tecnica di vitrificazione. Anche in questo caso il neonato era di sana e robusta costituzione. Successivamente, la vitrificazione fu adottata con successo dagli altri Autori con la pubblicazione di 10 ulteriori gravidanze (153, 154). Altre variazioni tecniche come l'utilizzo di un microambiente a basso contenuto di sodio ebbero come risultato la nascita di bambini normali (155, 156).

Analisi sui bambini sono state a lungo condotte da due gruppi (140, 157). Entrambi i gruppi di lavoro riportarono uno sviluppo

apparentemente normale della crescita dei bambini concepiti a partire da ovociti congelati. È fondamentale estendere il follow-up a tutti questi bambini. È stato recentemente attivato un Registro Internazionale delle nascite da ovociti congelati per la raccolta dei dati.

### **Bambini concepiti da seme crioconservato**

La crioconservazione degli spermatozoi umani è ampiamente usata e come procedura consolidata (158) e come importante opzione per le possibilità riproduttive maschili, permettendo di conservare spermatozoi sani sia nei pazienti azoospermici sia in quelli neoplastici.

La biopsia testicolare (TESE) trova una precisa indicazione nella azoospermia ostruttiva, ma anche in quella non ostruttiva, dato che nel 34% di questi casi gli spermatozoi possono essere facilmente recuperati dai testicoli (159).

Per quanto riguarda i pazienti neoplastici la crioconservazione spermatica è la sola possibilità per quelli che si stanno per sottoporre ad interventi chirurgici sul testicolo o a trattamenti di radio-chemioterapia. Sebbene l'utilizzo di spermatozoi crioconservati durante il ciclo di chemioterapia sia stato riportato come sicuro (160), il seme viene ciclicamente crioconservato prima dell'inizio del trattamento antineoplastico, considerando i potenziali rischi genetici per la progenie.

Il congelamento degli spermatozoi ottenuti mediante TESE è risultato essere un metodo preferibile al congelamento di spermatozoi isolati estratti chirurgicamente. Tuttavia, la fertilizzazione ed il concepimento sono stati ottenuti anche utilizzando spermatozoi isolati crioconservati (161-164). Il principale vantaggio della TESE è che la sopravvivenza e motilità degli spermatozoi sono migliori quando l'intero tessuto è crioconservato (165-167), poiché il tessuto testicolare funge da ambiente naturale che promuove la maturazione degli spermatozoi immaturi (164). Inoltre, la biopsia testicolare ha un costo più basso e previene, in questi pazienti, la necessità di chirurgia testicolare ripetuta per ottenere gli spermatozoi per i successivi cicli ICSI (168), pertanto riducendo il rischio chirurgico ed eliminando le principali complicazioni connesse alla ripetuta biopsia testicolare ovvero fibrosi, reazioni autoimmuni, processi infiammatori, ematomi, alterazioni del flusso ematico testicolare o totale devascularizzazione, assenza di spermatozoi nei prelievi successivi (169). Concludendo, l'utilizzo di tessuto testicolare crioconservato permette di sapere in anticipo la condizione della spermatogenesi e la stimolazione ovarica può essere evitata se gli spermatozoi non sono adeguati o sono assenti.

L'ipotesi che una biopsia testicolare potesse produrre spermatozoi per usi diversi, fu fatta per la prima volta nel 1913 (170). La tecnica di congelamento del tessuto testicolare, ottenuta mediante biopsia testicolare ed utilizzando glicerolo come crioconservatore, fu proposta nel 1996 (166-167).

L'introduzione della ICSI (171) aumentò considerabilmente il tasso di fertilizzazione da questi spermatozoi congelati-scongelati, mediante l'utilizzo di un solo spermatozoo per fertilizzare l'ovocita e non richiedendo un'elevata motilità. Tuttavia, il più importante fattore di predizione del successo dei risultati dell'ART, perfino nei cicli ICSI, è rappresentato dalla motilità degli spermatozoi dopo lavaggio; gli spermatozoi che presentano motilità dopo il processo di scongelamento sono probabilmente quelli funzionalmente intatti e che hanno maggiori possibilità di fertilizzare gli ovociti e di creare un embrione integro. Al contrario la durata della crioconservazione non è considerato un fattore determinante a predire la qualità degli spermatozoi scongelati: sono stati riportati due casi di impianto avvenuti con successo di embrioni scongelati ottenuti mediante ICSI e utilizzando spermatozoi congelati 11 e 17 anni prima (172).

La combinazione di TESE ed ICSI è così diventata ampiamente

utilizzata per i pazienti azoospermici in molti Centri. Molti studi (169, 173, 174) trovarono che il tasso di fertilizzazione (43-47%) era confrontabile con quello degli spermatozoi freschi derivanti da biopsia testicolare e più basso di quello da spermatozoi freschi eiaculati, mentre il tasso di gravidanza (20-25%) era simile.

Gravidanze conseguite a seguito di ICSI utilizzando spermatozoi scongelati ottenuti con biopsia testicolare in pazienti affetti da azoospermia ostruttiva furono presto riportate in molti altri Paesi (161, 164, 165, 175, 176) e furono assolutamente nella norma fino al termine.

Nel 1997 fu descritta una fertilizzazione avvenuta con successo ed una gravidanza utilizzando spermatidi ottenuti da biopsia testicolare in un paziente con arresto della maturazione nella spermatogenesi (177).

Uno studio simile condotto nello stesso anno confermò che gli spermatozoi testicolari, crioconservati con tessuto testicolare, mantenevano la loro integrità dopo lo scongelamento e che potevano essere usati per l'ICSI a fronte di scarsa qualità e relativa immaturità (168). Inoltre, fu riportato un nato vivo dal congelamento-scongelamento di embrioni ottenuti mediante ICSI utilizzando cellule spermatiche congelate estratte dopo orchietomia per seminoma (178).

Nel 2000 uno studio esaminò 135 cicli ICSI caratterizzati dall'utilizzo di spermatozoi testicolari congelati-scongelati (179). Ancora una volta, il tasso di gravidanza clinica fu del 30%, simile a quello ottenuto mediante ICSI con spermatozoi freschi eiaculati, e il tasso di fertilizzazione fu del 45%, leggermente più basso, ma questo fu probabilmente dovuto all'immaturità degli spermatozoi piuttosto che al danno da crioconservazione non essendo state trovate evidenze di

crio-danno nel tessuto testicolare ed essendo presente in tutti i casi una certa motilità degli spermatozoi.

Attualmente, la crioconservazione ha mostrato di causare alcuni danni strutturali e funzionali agli spermatozoi come la diminuzione di motilità, alterazioni della membrana acrosomiale e periferica, cambiamenti nel metabolismo dello spermatozoo (180). Inoltre, la crioconservazione di spermatozoi eiaculati è stata associata ad un incremento dell'incidenza di rotture del collo degli spermatozoi a seguito dello scongelamento, con conseguente più bassa capacità di fertilizzazione risultante dalla malformazione del centrosoma paterno collocato nella regione del collo (181). Tuttavia, può essere osservato anche negli spermatozoi scongelati un incremento della motilità progressiva conseguente alla maturazione, anche se meno evidente di quella degli spermatozoi freschi (182), e nella maggior parte degli studi furono trovati tassi di fertilizzazione comparabili fra spermatozoi congelati-scongelati, freschi estratti e freschi eiaculati (168, 173, 183).

Uno studio recente esaminò nel 2004 i risultati dell'ART utilizzando seme eiaculato crioconservato prodotto da pazienti neoplastici (184). Il 18,3% degli 87 cicli ART portò a gravidanza (7% IUI; 23% IVF; 37% ICSI) ed nel 75% delle gravidanze si registrò la nascita di bambini sani; circa il 40% dei pazienti ebbe nati vivi in buona salute. La possibilità di successo non apparve influenzata dal tipo di ART o dalla neoplasia.

Queste rilevazioni sono perfettamente comparabili con quelli degli studi precedenti ed evidenziano che la crioconservazione dello sperma umano è una procedura apparentemente sicura che non presenta particolari problemi tecnici.

## BIBLIOGRAFIA

1. Trownson and L. Mohr, *Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo*. *Nature* 1983; 305 pp. 707-709
2. Zeilmaker, G.H., Alberta, A.T., Van Gent, I. et al. *Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos*. *Fertil. Steril.* 1984; 42 pp.293-296
3. Dulioust, E., Toyama, K., Busnel, M.C., et al. *Long term effects of embryo freezing in mice*. *Proc., Natl., Acad. Sci. USA* 1995; 92 pp.589-593
4. Whittingham D.G., Leibo S.P. and Mazur P. *Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C*. *Science* 1972; 178 pp. 411-414
5. Edwards R.G. and Steptoe P.C. *Matter of Life*. Hutchinson, London, UK 1980
6. Kahn J.A., von Düring V., Sunde A., et al. *The efficacy and efficiency of an in-vitro fertilization programme including embryo cryopreservation: a cohort study*. *Hum Reprod* 1993; 8 pp. 247-252
7. Wang X.J., Ledger W., Payne D., et al. *The contribution of embryo cryopreservation to in-vitro fertilization/gamete intra-fallopian transfer: 8 years experience*. *Hum Reprod* 1994; 9 pp. 103-109
8. Van Voorhis B.J., Syrop C.H., Allen B.D., et al. *The efficacy and cost effectiveness of embryo cryopreservation compared with other assisted reproductive techniques*. *Fertil Steril* 1995; 64 pp. 647-650
9. Mandelbaum, J. Belaisch-Allart, A.M. Junca, J.M. et al. *Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes*. *Hum. Reprod.* 1998; 13 Suppl. 3 pp. 161-174
10. De Mouzon and P. Lancaster, *International working group for registers on assisted reproduction*. *J Assist Reprod Gen* 1997; 14 pp. 251S-265S
11. Levnan D., Dor J., Rudak E., et al. *Pregnancy potential of human oocytes—the effect of cryopreservation*. *N Engl J Med* 1990; 323 pp. 1153-1156
12. Selick C.E., G.E. Hofmann, C. Albano, et al. *Embryo quality and pregnancy potential of fresh compared with frozen embryos—is freezing detrimental to high quality embryos?*. *Hum Reprod* 1995; 10 pp. 392-395
13. Check J.H., Choe J.K., Nazari A., et al. *Fresh embryo transfer is more effective than frozen for donor oocyte recipients but not for donors*. *Hum Reprod* 2001; 16 pp. 1403-1408
14. Mandelbaum J., Junca A.M., Plachot M., et al. *Human embryo cryopreservation, extrinsic and intrinsic parameters of success*. *Hum Reprod* 1987; 2 pp. 709-715
15. Karlstrom P.O., Bergh T., Forsberg A.S., et al. *Prognostic factors for the success rate of embryo freezing*. *Hum Reprod* 1997 12 pp. 1263-1266
16. Burns W.N., Gaudet T.W., Martin M.B., et al. *Survival of cryopreservation and thawing with all blastomeres intact identifies multicell embryos with superior frozen embryo transfer outcome*. *Fertil Steril* 1999; 72 pp. 527-532
17. Van den Abbeel E., Camus M., Van Waesberghe L., et al. *Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation*. *Hum Reprod* 1997; 12 pp. 2006-2010
18. Edgar D.H., Bourne H., Speirs A.L. et al. *A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos*. *Hum Reprod* 2000 ;15 pp. 175-179
19. Guerif F, Bidault R, Cadoret V, et al. *Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal*. *Hum Reprod* 2002 17 pp. 1321-1326
20. Wang J.X, Yap Y.Y. and Matthews C.D. *Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception*. *Hum Reprod* 2001; 16 pp. 2316-2319
21. Check J.H., O'Shaughnessy A., Lurie D., et al. *Evaluation of the mechanism for higher pregnancy rates in donor oocyte recipients by comparison of fresh with frozen embryo transfer pregnancy rates in a shared oocyte programme*. *Hum Reprod* 1995; 10 pp. 3022-3027
22. Check J.H., Choe J.K., Katsoff D., et al. *Controlled ovarian hyperstimulation adversely affects implantation following in vitro fertilization-embryo transfer*. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16 pp. 416-420
23. Hu Y., Maxson W.S., Hoffman D.I, et al. *A comparison of post-thaw results between cryopreserved embryos derived from intracytoplasmic sperm injection and those from conventional IVF*. *Fertil Steril* 1999; 72 pp. 1045-1048
24. Van Steirteghem A.C., Van der Elst J., Van den Abbeel E., et al. *Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection*. *Fertil Steril* 1994; 62 pp. 775-780
25. Kowalik A., Palermo G.D., Barmat L., et al. *Comparison of clinical outcome after cryopreservation of embryos obtained from intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization*. *Hum Reprod* 1998; 13 p. 2848
26. Palermo, J. Cohen, M. Alikani, et al. *Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility*. *Fertil Steril* 1995; 63 pp. 1231-1240
27. Hoover L., Baker A., Check J.H, et al. *Clinical outcome of cryopreserved human pronuclear stage embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection*. *Fertil Steril* 1997; 67 pp. 621-624
28. Macas E., Imthurn B., Borsos M., et al. *Impairment of the developmental potential of frozen-thawed human zygotes obtained after intracytoplasmic sperm injection*. *Fertil Steril* 1998; 69 pp. 630-635
29. Damario M.A., Hammitt D.G., Galanits T.M., et al. *Pronuclear stage cryopreservation after intracytoplasmic sperm injection and conventional IVF: implications for timing of the freeze*. *Fertil Steril* 1999; 72 pp. 1049-1054
30. Wennerholm W.B., *Cryopreservation of embryos and oocytes: obstetric outcome and health in children*. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 5 pp. 18-25
31. Nikolettos N., Al-Hasani S., Felberbaum R., et al. *Comparison of cryopreservation outcome with human pronuclear stage oocytes obtained by the GnRH antagonist, cetrorelix, and GnRH agonists*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 93 pp. 91-95
- 32vSeelig A.S., Al-Hasani S., Katalinic A., et al. *Comparison of cryopreservation outcome with gonadotropin-releasing hormone agonists or antagonists in the collecting cycle*. *Fertil Steril* 2002; 77 pp. 472-475
33. Schalkoff M.E., Oskowitz S.P. and Powers R.D., *A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful embryo cryopreservation program*. *Fertil Steril* 1993; 59 pp. 1070-1074

34. Lin, Y., Cassidenti, D., Chacon, R. et al. **Successful implantation of frozen sibling embryos is influenced by the outcome of the cycle from which they were derived.** *Fertil. Steril.* 1995; 63 pp. 262-267
35. Ben-Ozer S, Vermesh M. **Full term delivery following cryopreservation of human embryos for 7,5 years.** *Hum Reprod.* 1999;14(6) pp.1650-2
36. Revel A., Safiran A., Laufer N., et al. **Twin delivery following 12 years of human embryo cryopreservation: case report.** *Hum Reprod.* 2004; 19 (2) pp.328-329
37. Lopez Teijon M., Serra O., Olivares R., et al. **Delivery of a healthy baby following the transfer of embryos cryopreserved for 13 years.** *Reprod Biomed Online* 2006; 13 (6) pp.821-822
38. Sutcliffe, A., D'Souza, S., Cadman, J. et al. **Minor congenital anomalies, major congenital malformations and development in children conceived from cryopreserved embryos.** *Hum. Reprod.* 1995a 10 pp. 3332-3337
39. Shaw, J.M. and Trounson, A. **Effect of dimethylsulfoxide and protein concentration on the viability of two-cell mouse embryos frozen with a rapid freezing technique.** *Cryobiology* 1989; 26 413-421
40. Rall, W.F., Wood, M.J., Kirby, C. et al. **Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification.** *J. Reprod. Fertil.* 1987; 80 pp. 499-504
41. Kono, T. and Tsunoda, Y. **Ovicidal effects of vitrification solution and the vitrification-warming cycle and establishment of the proportion of toxic effects on nuclei and cytoplasm of mouse embryos.** *Cryobiology* 1988; 25 197-202
42. Trounson, A., Peura, A., Freeman, L. et al. **Ultraprapid freezing of early cleavage state human embryos and eight-cell mouse embryos.** *Fertil. Steril.* 1988; 49 pp. 822-826
43. Wilson, L. and Quinn, P. **Development of mouse embryos cryopreserved by an ultrarapid method of freezing.** *Hum. Reprod* 1989; 4 pp. 86-90
44. Liu, J., Van Den Abbeel, E. and Van Steirteghem, A. **Assessment of ultrarapid and slow freezing procedures for 1-cell and 4-cell mouse embryos.** *Hum. Reprod* 1993; 7 pp. 1115-1119
45. Olivennes F, Rufat P, Andre B, et al. **The increased risk of complication observed in singleton pregnancies resulting from in-vitro fertilization (IVF) does not seem to be related to the IVF method itself.** *Hum Reprod.* 1993; 8(8) pp.1297-300
46. Tanbo, P.O.; Dale, O.; Lunde, N.; et al. **Obstetric outcome in singleton pregnancies after assisted reproduction.** *Obstet Gynecol* 1995; 86 pp. 188-192
47. Frydman, R., Forman, R.G., Belaisch-Allart, J. et al. **An obstetric analysis of fifty consecutive pregnancies after transfer of cryopreserved human embryos.** *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989; 160 pp. 209-213
48. Rizk, B., Edwards, R.G., Nicolini, U. et al. **Edward's syndrome after the replacement of cryopreserved-thawed embryos.** *Fertil. Steril.* 1991; 55 pp. 208-210
49. Deffontaines, D., Logerot-Lebrun, H., Sele, B. et al. **Comparaison des grossesses issues de transferts d'embryons congelés aux grossesses issues de transferts d'embryons frais en fécondation in vitro.** *Contracept. Fertil. Sex.* 1994 ; 22 pp. 287-291
50. Wada I., Macnamee M.C., Wick K., et al. **Birth characteristics and perinatal outcome of babies conceived from cryopreserved embryos.** *Hum Reprod* 1994; 9 pp. 543-546
51. Heijnsbroek I, Helmerhorst FM, van den Berg-Helder AF, et al. **Follow-up of 30 pregnancies after embryo cryopreservation.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995; 59(2) pp. 201-4
52. Sutcliffe, A.G., D'Souza, S.W., Cadman, J. et al. **Outcome in children from cryopreserved embryos.** *Arch. Dis. Child.* 1995b; 72 pp. 290-293
53. Olivennes, F., Schneider, Z., Remy, V. et al. **Perinatal outcome and follow-up of 82 children aged 1-9 years old conceived from cryopreserved embryos.** *Hum. Reprod.* 1996; 11 pp. 1565-1568
54. Wennerholm, L; Hamberger, L; Nilsson, M; et al. **Obstetric and perinatal outcome of children conceived from cryopreserved embryos.** *Hum Reprod* 1997; 12 pp. 1819-1825
55. Wood, M.J. **Embryo freezing: is it safe?** *Hum. Reprod.* 1997; 12 (natl suppl., 1) pp. 32-37
56. Wennerholm, U.B., Albertsson-Wikland K., Bergh, C. et al. **Post-natal growth and health in children born after cryopreservation as embryos.** *Lancet* 1998; 351 pp. 1085-1090
57. Bergh T, Ericson A, Hillensjo T, et al. **Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study.** *Lancet.* 1999 Nov 6;354(9190) pp.1579-85
58. Lane, M. and Gardner, D.K. **Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions.** *J. Reprod. Fertil.* 1994; 102 pp. 305-312
59. Thompson, J.G., Gardner, D.K., Pugh, P.A. et al. **Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos.** *Biol. Reprod.* 1995; 53 pp. 1385-1391
60. Karran, G. and Legge, M. **Non-enzymatic formation of formaldehyde in mouse oocyte freezing mixtures.** *Hum. Reprod.* 1996; 11 pp. 2691-2686
61. Mahadevan, M.M., McIntosh, A., Miller, M.M. et al. **Formaldehyde in cryoprotectant propanediol and effect on mouse zygotes.** *Hum. Reprod.* 1998; 13 pp. 979-982
62. Bonduelle, M., Joris, H., Hofmans. K. et al. **Mental development of 201 ICSI children at 2 years of age.** *Lancet* 1998 ; 351 pp.1553
63. Bowen, J., Gibson, F.L., Leslie, G.I. et al. **Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection.** *Lancet* 1998; 351 pp. 1529-1534
64. Sheppard, D.M., Fisher, R.A., Lawler, S.D. et al. **Tetraploid conceptus with three paternal contributions.** *Hum. Genet.* 1982; 62 pp. 371-374
65. Warburton, D., Byrne, J. and Canki, N. (eds) **Chromosome Anomalies and Prenatal Development: An Atlas.** *Oxford Monographs on Medical Genetics.* No. 21, Oxford University Press 1991
66. Hui, S.W., Stewart, T.P. and Boni, L.T. et al. **Membrane fusion through point defects in bilayers.** *Science* 1981; 212 pp. 921-923
67. Zimmermann, U. and Vienken, J. **Electric field-induced cell-to-cell fusion.** *J. Membrane Biol.* 1982; 67 pp. 165-182
68. Ng, S.C., Sathananthan, A.H., Wong, P.C. et al. **Fine structure of early human embryos frozen with 1,2 propanediol.** *Gamete Res.* 1988; 19 pp. 253-263
69. Dumoulin, J.C., Bergers-Janssen, J.M., Pieters, M.H., et al. **The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pel-**

- lucidae and embryos. *Fertil. Steril.* 1994; 62 pp. 793–798
70. Trounson, A. *In vitro* fertilization and embryo preservation. In Trounson, A. and Wood, C. (eds) *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. Churchill Livingstone, Edinburgh 1984; pp. 111–130
  71. Balakier, H., Zenzes, M., Wang, P. et al. The effect of cryopreservation on development of S- and G2-phase mouse embryos. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer* 1991; 8 pp. 89–95
  72. Bongso, A., Chye, N.S., Sathananthan, H. et al. Chromosome analysis of two-cell mouse embryos frozen by slow and ultrarapid methods using two different cryoprotectants. *Fertil. Steril.* 1988; 49 pp. 908–912
  73. Ishida, G.M., Saito, H., Ohta, N. et al. The optimal equilibration time for mouse embryos frozen by vitrification with trehalose. *Hum. Reprod.* 1997; 12, 1259–1262
  74. Shaw, J.M., Kola, I., MacFarlane, D.R. et al. A.O. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J. Reprod. Fertil.* 1991; 91 pp. 9–18
  75. Dale, B., Gualtieri, R., Talevi, R. et al. Intercellular communication in the early human embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 1991; 29 pp. 22–28
  76. Mottla, G.L., Adelman, M.R., Hall, J.L. et al. Lineage tracing demonstrates that blastomeres of early cleavage-stage human pre-embryos contribute to both trophectoderm and inner cell mass. *Hum. Reprod.* 1995; 10 pp. 384–391
  77. Laverge, H., Van der Elst, J., De Sutter, P. et al. Fluorescent *in situ* hybridization on human embryos showing cleavage arrest after freezing and thawing. *Hum. Reprod.* 1998; 13 pp. 425–429
  78. Balakier H, Cabaca O, Bouman D, et al. Spontaneous blastomere fusion after freezing and thawing of early human embryos leads to polyploidy and chromosomal mosaicism. *Hum Reprod.* 2000;15(11) pp. 2404-10
  79. James, R.M. and West, J.D. A chimaeric animal model for confined placental mosaicism. *Hum. Genet.* 1994; 93 pp. 603–604
  80. Ginsburg, K.A., Johnson, M.P., Sacco, A.G. et al. Tetraploidy after frozen embryo transfer: cryopreservation may interfere with first mitotic division. 39th Annual Meeting of the Pacific Coast Fertility Society. 1991 P-196, Abstracts of oral and poster presentations. Program Supplement, S169
  81. Henery, C., Bard, J.B.L., Kaufman, M.H. Tetraploidy in mice, embryonic cell number, and the grain of the developmental map. *Dev. Biol.* 1992; 152 pp. 233–241
  82. Tanbo T, Abyholm T. Obstetric and perinatal outcome in pregnancies after assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1996; 8(3) pp.193-8  
Review
  83. Wright G, Wiker S, Elsnser C, et al. Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum Reprod.* 1990; 5(1) pp.109-15
  84. Van der Auwera I, Meuleman C, Koninckx PR. Human menopausal gonadotrophin increases pregnancy rate in comparison with clomiphene citrate during replacement cycles of frozen/thawed pronucleate ova. *Hum Reprod.* 1994;9(8) pp. 1556-60
  85. Al-Hasani S., Ludwig M., Gagsteiger F, et al. Comparison of cryopreservation of supernumerary pronuclear human oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and after conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1996; 11 pp. 604–607
  86. Go, K., Corson, S., Batzer, F. et al. Live birth from a zygote cryopreserved for 8 years. *Hum. Reprod.* 1998; 13 pp. 2970–2971
  87. Tucker, P.C. Morton, C.L. Sweitzer et al. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1995; 7 pp. 188–192
  88. Kaufman, Y. Menezo, A. Hazout, B. et al. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 1995 64 pp. 1125–1129
  89. Khorram, S.S. Shapiro and J.M. Jones. Transfer of nonassisted hatched and hatching human blastocysts after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2000; 74 pp. 163–165
  90. Shapiro, K. Richter, D. Harris et al. A comparison of day 5 and 6 blastocyst transfers. *Fertil Steril* 2001; 75 pp. 1126–1130
  91. Sagoskin, T. Han, J.R. Graham, M.J. et al. Healthy twin delivery after day 7 blastocyst transfer coupled with assisted hatching. *Fertil Steril* 2002; 77 pp. 615–617
  92. Porter, M.J. Tucker, J. Graham et al. Advanced embryo development during extended in vitro culture: observations of formation and hatching patterns in non-transferred human blastocysts. *Hum Fertil* 2002; (Camb) 5 pp. 215–220
  93. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, et al. Oocyte cryopreservation in oncological patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004; Apr 5;113 Suppl 1:S14-6
  94. Whittingham DG. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at –196 degrees C. *J Reprod Fertil.* 1977; 49(1) pp. 89-94
  95. Vincent, C. and Johnson, M.H. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 1992; 14 pp. 73–100
  96. Kazem, R., Thompson, L.A., Srikantharajah, A., et al. Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1995 10 pp.2650–2654
  97. Van Blerkom and P. Davis, Cytogenetic, cellular and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Microsc. Res. Tech.* 1994; 27 pp. 165–193
  98. Pickering, S.J., Brande, P.R. and Johnson, M.H. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption to the meiotic spindle in human oocytes. *Fertil. Steril.* 1990; 54 pp. 102–108
  99. Wang, W.H., Meng, L., Hackett, R.J., et al. Limited recovery of meiotic spindle in living human oocytes after cooling–rearming observed using polarized light microscopy. *Hum. Reprod.* 2001a; 16 pp. 2374–2378
  100. Wang, W.H., Cao, B., Meng, L., et al. Imaging living, human MII oocytes with the polscope reveals a high proportion of abnormal meiotic spindles. *Fertil. Steril* 2001b; 76 (Suppl. 1) S2
  101. Mazur, P., Rall, W.F. and Leibo, S.P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova: Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophys.* 1984; 6 pp. 197–213

102. Bernard, A., McGrath, J.J., Fuller, B.J., et al. Osmotic response of oocytes using a microscope diffusion chamber: a preliminary study comparing murine and human ova. *Cryobiology* 1988; 25 pp. 495-501
103. Magistrini M, Szollosi D. Effects of cold and of isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. *Eur J Cell Biol.* 1980; 22(2) pp.699-707
104. Mandelbaum J, Anastasiou O, Levy R, et al. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004 Apr 5;113 Suppl 1:S17-23
105. Maudlin I, Fraser LR. Maternal age and the incidence of aneuploidy in first-cleavage mouse embryos. *J Reprod Fertil.* 1978; 54(2) pp. 423-6.
106. Kaufman MH. Parthenogenesis in the mouse. *Nature.* 1973 Apr 13;242(5398) pp. 475-6
107. Santalo J, Estop AM, Egozcue J. The chromosome complement of first-cleavage mouse embryos after in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1986; 3(2) pp.99-105
108. Maudlin I, Fraser LR. The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized in vitro. *J Reprod Fertil.* 1977; 50(2) pp. 275-80
109. Glenister PH, Wood MJ, Kirby C, et al. Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. *Gamete Res.* 1987; 16(3) pp. 205-16
110. Kola I, Cirby C., Shaw J., et al. Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. *Teratology* 1988; 38 pp. 467-474
111. Carrol J., Warnes G.M., Matthews C.D., et al. Increase in digyny explains ploidy after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1989; 85 pp. 489-494
112. Plachot M, Mandelbaum J, Junca AM, et al. Cytogenetic analysis and developmental capacity of normal and abnormal embryos after IVF. *Hum Reprod.* 1989; 4(8 Suppl) pp. 99-103
113. Sterzik K, Rosenbusch B, Grab D, et al. Numerical chromosome anomalies after fertilization of freeze-thawed mouse oocytes. *Arch Gynecol Obstet.* 1992; 251(3) pp.133-8
114. Battaglia, D.E., Goodwin, P., Klein, N.A. et al. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum. Reprod.* 1996; 11 pp. 2217-2222
115. Sandalinas, C. Marquez and S. Munne, Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 2002; 8 pp. 580-585
116. Johnson MH, Pickering SJ. The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development.* 1987;100(2) pp.313-24
117. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, et al. Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod.* 1988;3(8) pp. 960-7
118. Sathananthan, A. Trounson, L. Freeman et al. The effects of cooling human oocytes. *Hum Reprod* 1988; 3 pp. 968-977
119. Gook, S.M. Osborn and W.I. Johnston. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Hum. Reprod.* 1993; 8 pp. 1101-1109
120. Almeida P. A. and Bolton V.N. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* 1995; 3 pp. 357-365
121. Zenzes, R. Bielecki, R.F. Casper et al. Effects of chilling to 0 °C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil. Steril.* 2001; 75 pp. 769-777
122. Fahy, D.R. McFarlane, C.A. et al. Meryman Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21 pp. 407-426
123. Trouson A., Peura A., Kirby C. Ultrarapid freezing : a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.* 1987; 48:843-850
124. Toth, S.E. Lanzendorf, B.A. Sandow, L.L. et al. Cryopreservation of human prophase I oocytes collected from unstimulated follicles. *Fertil. Steril.* 1994; 61 pp. 1077-1082
125. Son, S.E. Park, K.A. Lee, W.S. et al. Effects of 1,2-propanediol and freezing-thawing on the in vitro developmental capacity of human immature oocytes. *Fertil. Steril* 1996; 66 pp. 995-999
126. Park, W.Y. Son, S.H. Lee, K.A. et al. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil. Steril.* 1997; 68 pp. 920-926
127. Boiso I, Marti M, Santalo J, et al. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. *Hum Reprod.* 2002;17(7) pp.1885-91
128. Baka, T.L. Toth, L.L. Veeck, H.W, et al. Evaluation of the spindle apparatus of in-vitro matured human oocytes following cryopreservation. *Hum. Reprod.* 1995; 10 pp. 1816-1820
129. Cobo, A., Rubio, C., Gerli, S., et al. Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. *Fertil. Steril.*, 2001; 75 pp. 354-360
130. Tucker, G. Wright, P.C. Morton et al. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil. Steril.* 1998; 70 pp. 578-579
131. Chen, C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986; i pp. 884-886
132. Chen, C. Pregnancies after human oocyte cryopreservation. *Ann NY Acad Sci* 1988; 54 pp. 541-549
133. Van Uem, J.F., Siebzehnrubl, E.R., Schub, B., et al. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* 1987; i pp. 752-753
134. Porcu, E., Fabbri, R., Seracchioli, R., et al. C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil. Steril.* 1997; 68 pp. 724-726
135. Porcu, E., Fabbri, R., Seracchioli, R., et al. Birth of six healthy children after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Hum. Reprod* 1998; 13 (Abstract book 1) p. 124
136. Porcu, E., Fabbri, R., Ciotti, P.M., et al. Cycles of human oocyte cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection: results of 112 cycles. *Fertil. Steril.* 1999; 72 (Suppl. 1) S2
137. Porcu, E., Fabbri, R., Petracchi, S., et al. Ongoing pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of testicular spermatozoa into cryopreserved human

- oocytes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999a; 180 pp. 1044–1045
138. Porcu, E., Fabbri, R., Ciotti, P.M., et al. *Ongoing pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of epididymal spermatozoa into cryopreserved human oocytes.* *J. Assist. Reprod. Genet.* 1999b; 16 pp. 283–285
  139. Porcu, E., Fabbri, R., Damiano, et al. *Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation.* *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000; 169 pp. 33–37
  140. Porcu E., Fabbri R., Seracchioli R., et al. *Obsterics, perinatal outcome and follow up of children conceived from cryopreserved oocytes.* *Fertil Steril* 2000a; Vol.74, n.3S, Suppl.1 S48
  141. Porcu E., Fabbri R., Ciotti P.M., et al. *Four healthy children from frozen human oocytes and frozen human sperms.* *Fertil Steril* 2001; Vol. 76, N°3S, S76
  142. Porcu E. *Oocyte freezing.* *Semin Reprod Med* (2001a) 19 pp. 221–230
  143. Porcu, E., Fabbri, R., Ciotti, et al. *Oocytes or embryo storage?.* *Fertil. Steril.* 2002; 169 (Suppl. 1) S15
  144. Polak de Fried E, Notrica J, Rubinstein M, et al. *Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure.* *Fertil Steril.* 1998;69(3) pp.555-7
  145. Yang DS, Winslow KL, Blohm PL. *Improved survival rate after cryopreservation of human fresh and aged unfertilized oocytes using a specially developed oocyte cryopreservation regime.* *Fertil Steril* 1998; 70(Suppl 1) S86. Abstract O-232
  146. Naurath F, Kissling K. *Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of cryopreserved human oocytes.* *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1998; 77(4) pp.462-3
  147. Borini, A., Baffaro, M.G., Bonu, M.A., et al. *Pregnancies after freezing and thawing human oocytes. Preliminary data.* *Hum. Reprod.* 1998; 13 (Abstract book 1) pp.124–125
  148. Antinori S., Dani G., Selman, H.A., et al. *C. Pregnancy after sperm injection into cryopreserved human oocytes.* *Hum. Reprod.* 1998; 13 (Abstract book 1) pp. 157–158
  149. Chen S.U., Lien I. R., Tsai Y. et al. *Successful pregnancy occurred from slowly freezing human oocytes using the regime of 1.5 mol/l 1,2-propanediol with 0.3 mol/l sucrose.* *Hum Reprod* 2002; 17 (5) pp. 1412
  150. Fosas N, Marina F, Torres PJ, et al. *The births of five Spanish babies from cryopreserved donated oocytes.* *Hum Reprod.* 2003;18(7) pp.1417-21
  151. Young E, Kenny A, Puigdomenech E, et al. *Triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved oocytes: case report.* *Fertil Steril.* 1998; 70(2) pp.360-1
  152. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, et al. *Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report.* *Hum Reprod.* 1999; 14(12) pp.3077-9
  153. Yoon TK, Kim TJ, Park SE, et al. *Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program.* *Fertil Steril.* 2003; 79(6) pp. 1323-6
  154. Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M, et al. *High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy.* *Fertil Steril.* 2003; 80(1) pp. 223-4
  155. Quintans CJ, Donaldson MJ, Bertolino MV, et al. *Birth of two babies using oocytes that were cryopreserved in a choline-based freezing medium.* *Hum Reprod.* 2002;17(12) pp.3149-52
  156. Boldt J, Cline D, McLaughlin D. *Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles.* *Hum Reprod.* 2003;18(6) pp.1250-5
  157. Winslow KL, Yang D., Blohm PL., et al. *Oocyte cryopreservation/a three year follow up of sixtenn birth*
  158. Brotherton J. *Cryopreservation of human semen.* *Arch Androl.* 1990; 25(2) pp.181-95. Review
  159. Jow, J. Steckel, P.N. Schlegel, et al. *Motile sperm in human testis biopsy specimens.* *J Androl* 1993; 14 pp. 194–198
  160. Carson, S.A., Gentry, W.L., Smith, A.L. et al. *Feasibility of semen collection and cryopreservation during chemotherapy.* *Hum. Reprod.* 1991; 6 pp. 225–229
  161. Gil-Salom M, Romero J, Minguez Y, et al. *Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa.* *Hum Reprod.* 1996; 11(6) pp.1309-13
  162. Podsiadly BT, Woolcott RJ, Stanger JD, et al. *Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of cryopreserved spermatozoa recovered from testicular biopsy.* *Hum Reprod.* 1996;11(6) pp.1306-8
  163. Romero, J. Remohí, Y. Mínguez, et al. *Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa.* *Fertil Steril* 1996; 65 pp. 877–879
  164. Khalifeh FA, Sarraf M, Dabit ST. *Full-term delivery following intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular tissue.* *Hum Reprod.* 1997;12(1) pp.87-8
  165. Fischer, V. Baukloh, O.G.J. Naether, et al. *Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa extracted from frozen-thawed testicular biopsy.* *Hum Reprod* 1996; 11 pp. 2197–2199
  166. Hovatta O, Foudila T, Sieberg R, et al. *I. Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of spermatozoa from a frozen-thawed testicular biopsy specimen.* *Hum Reprod.* 1996; 11(11) pp. 2472-3
  167. Salzbrunn, D.M. Benson, A.F. Holstein et al. *A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI).* *Hum Reprod* 1996; 11 pp. 752–755
  168. Perraguin-Jayot, A. Audebert, J.C. Emperaire et al. *Ongoing pregnancies after intracytoplasmic injection using cryopreserved testicular spermatozoa.* *Hum Reprod* 1997; 12 pp. 2706–2709
  169. Schlegel and L.-M. Su, *Physiological consequences of testicular sperm extraction.* *Hum Reprod* 1997; 12 pp. 1688–1692
  170. *Real encyclopaedia for practitioners.* 1913, Band XIII. Devroey, J. Liu, Z. Nagy, A
  171. Palermo G., Joris H., Devroey P., et al. *Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoa into an oocyte.* *Lancet* 1992; 340 pp. 17-18
  172. Horne G, Atkinson A, Brison DR, et al. *Achieving pregnancy against the odds: successful implantation of frozen- thawed embryos generated by ICSI*

- using spermatozoa banked prior to chemoradiotherapy for Hodgkin's disease and acute leukemia: case report. *Hum Reprod* 2001;16 pp. 107-9
173. Nagy, J. Liu, C. Janssenswillen, et al. Using ejaculated, fresh and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995; 63 pp. 808-815
174. Devroey, J. Liu, Z. Nagy, et al. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1995 10 pp. 101-104
175. 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 pp. 734-9
176. Windt ML, Coetzee K. Ongoing pregnancies resulting from intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of spermatozoa from frozen-thawed testicular biopsy specimens. *Andrologia.* 1999; 31(3) pp.169-72
177. Antinori S., Versaci C., Dani G., et al. **Successful fertilization and pregnancy after injection of frozen-thawed round spermatids into human oocytes.** *Hum Reprod.* 1997;12(3) pp. 554-6
178. Yavetz, H., Hauser, R., Botchan, A. et al. Pregnancy resulting from frozen-thawed embryos achieved by intracytoplasmic injection of cryopreserved sperm cells extracted from an orchidectomized, seminoma-bearing testis, causing obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.* 1997; 12 pp. 2836-2838
179. Kupker W., Schlegel P. N. et al., Use of frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. and steril.* 2000; 73 (3) pp. 453-458
180. Windt ML, Coetzee K. Pregnancies resulting from intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa from frozen-thawed testicular biopsy specimens. *S Afr Med J.* 1998; 88(10) pp.1348
181. Verbeyen, Z. Nagy, H. Joris, I. et al. Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertil Steril* 1997; 67 pp. 74-80
182. Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL, et al. Changes in motility patterns during in-vitro culture of fresh and frozen/thawed testicular and epididymal spermatozoa: implications for planning treatment by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996;11(11) pp.2474-6
183. Windt ML, Stander FS, Coetzee K, et al. **Intracytoplasmic sperm injection--new hope for severe male factor infertility.** *S Afr Med J.* 1997; 87(9) pp.1154
184. Agarwal A., Ranganathan P., Kattal N., et al. Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens. *Fertil Steril.* 2004; 81(2) pp. 342-8