

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**  
Facoltà di Scienze Naturali, Fisiche e Matematiche  
Corso di Laurea in Scienze Biologiche

---

**VALIDAZIONE DI PROTOCOLLI DI CRIOCONSERVAZIONE  
DEL LIQUIDO SEMINALE ALL'INTERNO DI PROGRAMMI DI  
FECONDAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA**

Relatrice:

*Prof.ssa Renata VISCUSO*

Correlatori:

*Dott. Giovanni BRACCHITTA*

*Dott. Nunzio MINNITI*

Candidata:

*Stefania TIDONA*

---

*Ai miei genitori.*

## INDICE

PREMESSA.....	p. 4
INTRODUZIONE.....	p. 5
1 L'infertilità.....	p. 5
1.1 Le cause dell'infertilità.....	p. 5
1.2 Le tecniche di cura dell'infertilità.....	p. 13
2 La crioconservazione.....	p. 16
2.1. Origine e biofisica della crioconservazione.....	p. 16
2.2. Strumenti della crioconservazione.....	p. 19
2.3. Indicazioni per i pazienti.....	p. 20
2.4. I danni dovuti ai processi di congelamento e scongelamento.....	p. 22
2.5. I crioprotettori.....	p. 25
2.6. Le tecniche di congelamento.....	p. 31
2.7. Successo della crioconservazione.....	p. 33
3 Scopo del lavoro.....	p. 35
4 Materiali e metodi.....	p. 36
5 Risultati e discussione.....	p. 41
6 Conclusioni.....	p. 48
BIBLIOGRAFIA.....	p. 50
RINGRAZIAMENTI.....	p. 56

## **PREMESSA**

L'infertilità è definita come l'incapacità di ottenere una gravidanza dopo almeno dodici mesi di rapporti liberi e non protetti. Si distinguono una infertilità primaria, nel caso in cui non si è mai verificato un concepimento, e una infertilità secondaria, se l'incapacità di procreare si presenta dopo uno o più concepimenti precedenti [1]. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (O.M.S.) oggi nel mondo il 15-20% delle coppie non è fertile; ciò vuol dire che 50-80 milioni di soggetti hanno problemi a concepire. In Italia il tasso di infertilità di coppia è pari al 30% [2]. Negli ultimi anni la percentuale di maschi infertili è in forte ascesa rispetto al decennio scorso, ciò ha contribuito ad ampliare il ruolo della criobiologia nel campo della Fecondazione Medicalmente Assistita (PMA); infatti, la possibilità di conservare gli spermatozoi a temperature molto basse consente di preservare la fertilità per tempi lunghi e di mantenerla nei casi in cui i pazienti siano esposti a patologie e/o trattamenti che causano danni alla capacità di procreare.

# INTRODUZIONE

## 1 L'infertilità

### 1.1 Le cause dell'infertilità

Il 20% dei casi di infertilità è dovuta alla componente maschile. L'eziologia dell'infertilità maschile è multifattoriale:

- *Infezioni genito-urinarie e malattie virali che possono provocare l'orchite.* Il 10-15% dei casi di infertilità è dovuto a diversi agenti infettivi, batteri principalmente ma anche virus e miceti, e alle infezioni delle ghiandole accessorie maschili, le cosiddette M.A.G.I. (Male Accessory Gland Infections).

Gli agenti infettivi riescono a raggiungere gli organi riproduttivi attraverso il sangue o le lesioni che possono essere presenti nell'uretra e alterano le funzioni riproduttive in diversi modi: ad esempio essi possono portare ad una attività anomala delle cellule germinali, delle cellule del Sertoli, delle cellule di Leydig oppure stimolare l'infiltrazione di leucociti nell'apparato riproduttivo, portando così ad un'infertilità di tipo autoimmune, nei casi più gravi, inoltre, possono causare l'ostruzione parziale o totale dei dotti escretori. In base alla sede dell'infezione, alla porzione di tessuto che viene distrutto e all'alterazione di funzione subita dall'organo si distinguono infezioni asintomatiche e sintomatiche. Tra le infezioni sintomatiche sono molto diffuse le uretriti e le epididimiti; le prime provocano i sintomi caratteristici dell'infiammazione ma anche perdite e disuria, cioè difficoltà nell'emissione delle urine mentre nel secondo caso si può avere dolore, arrossamento della cute e tumefazione dell'epididimo e del testicolo.

Tra i batteri gram-negativi maggiormente responsabili delle infezioni genito-urinarie maschili si annoverano *Escherichia coli*, che causa epididimiti acute e prostatovescicoliti croniche, ma anche *Ureaplasma Urealyticum* e *Chlamydia Trachomatis*,

responsabili maggiormente di infezioni croniche. Oltre ai batteri anche i virus possono causare infertilità attraverso diversi meccanismi. Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) induce fibrosi interstiziale, infiltrazione linfocitaria che porta a infertilità autoimmune, alterazione del numero delle cellule di Leydig, diminuzione del numero delle cellule germinali, alterazioni della spermatogenesi che portano alla produzione di un liquido seminale con azoospermia e oligozoospermia, cioè di un liquido seminale con una concentrazione di spermatozoi scarsa o nulla [3]. Anche il virus herpes simplex di tipo 2 (HSV 2) induce infertilità perché può determinare azoospermia e oligozoospermia.

Alcune malattie infettive sono causa di infertilità se contratte in età riproduttiva. In particolare, fonti dell'Istituto Superiore di Sanità (I.S.S.) attestano che nel 20-30% dei maschi che contraggono la parotite dopo la pubertà si assiste all'insorgenza di orchite, una malattia infiammatoria molto dolorosa caratterizzata dal gonfiore di uno o di entrambi i testicoli. In alcuni casi l'orchite può evolversi in complicazioni quali la sclerosi dei tubuli seminiferi e l'atrofia del testicolo. L'orchite rappresenta una complicazione anche di infezioni quali l'HIV, l'Adenovirus, il virus coxsackie, il virus Epstein-Barr (EBV); la varicella, invece, evolve in orchite solo raramente e anche quando si verifica ciò, l'infezione si risolve in un breve periodo di tempo [4].

Le M.A.G.I sono dovute maggiormente alla diffusione di agenti patogeni, quali *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*, nella prostata e nelle vescichette seminali e possono comportare prostatiti croniche che, causando modificazioni biochimiche del secreto prostatico come l'aumento del pH e la riduzione di componenti importanti quali zinco, magnesio, acido citrico e fosfatasi acida, influenzano negativamente la fluidificazione e la viscosità del plasma seminale, e la motilità degli spermatozoi; un'ulteriore conseguenza di queste infezioni è l'aumento dei leucociti nel liquido prostatico, definito leucocitospermia, e la successiva riduzione della motilità e, quindi, della capacità fecondante del liquido seminale.

- *Varicocele*. Principale causa di infertilità maschile, colpisce circa il 17-20% degli italiani soprattutto nella fascia d'età tra i 25 e i 35 anni [16], il varicocele è la dilatazione varicosa delle vene testicolari e si presenta prevalentemente a sinistra a causa del percorso delle vene stesse. La fisiopatologia del processo è ancora incerta,

infatti è difficile identificare il fattore dominante e si pensa che molte cause diverse contribuiscano a causare il fenotipo infertile tipico di questa patologia:

1. Ipertermia. La temperatura scrotale è solitamente mantenuta pochi gradi al di sotto della temperatura corporea in modo tale da ottimizzare l'ambiente idoneo alle normali funzioni testicolari. L'aumento della pressione venosa testicolare potrebbe comportare l'inefficienza del sistema e alterare la funzione del testicolo controlaterale poiché esiste un drenaggio collaterale fra i due testicoli [6];
2. Pressione venosa. L'aumento della pressione venosa influenza i capillari testicolari provocando lo squilibrio della pressione intracapillare e, di conseguenza, il danneggiamento del metabolismo testicolare [7];
3. Squilibrio ormonale. Studi di laboratorio effettuati dall'O.M.S. nel 1992 hanno dimostrato che soggetti di età superiore ai trent'anni con varicocele presentano livelli di testosterone sierico più bassi rispetto ai soggetti under trenta [8]; questa differenza non è stata però riscontrata nei soggetti non affetti da varicocele. Tali osservazioni hanno permesso all'O.M.S. di concludere che la presenza di varicocele comporta la progressiva alterazione della funzione delle cellule di Leydig. Ulteriori studi si stanno ora concentrando sulle conseguenze che potrebbe avere la presenza di varicocele sulla funzione delle cellule del Sertoli; sembra, infatti che l'attività di queste componenti subisca una riduzione a causa delle variazioni dei livelli di inibina B sierica [9].
4. Sostanze tossiche. Parecchi studi hanno rivelato che diverse sostanze endogene ed esogene sono responsabili della fisiopatologia del varicocele. L'accumulo di metaboliti endogeni nella circolazione renale e surrenale, provocato dall'aumento del reflusso venoso in uomini affetti da varicocele, può compromettere la qualità del seme [10]; a questo riguardo alcuni ricercatori hanno postulato che l'aumento della concentrazione di catecolamine nel circolo surrenale potrebbe causare la vasocostrizione testicolare e danneggiare il flusso testicolare di sangue [11]. Tra le sostanze esogene il fumo di sigaretta influenza negativamente i parametri seminali [12] mentre l'esposizione e l'accumulo di cadmio nell'organismo compromette la spermatogenesi, la funzione spermatica e di conseguenza, il potenziale riproduttivo. È stata riscontrata tuttavia una suscettibilità genetica al danno testicolare derivante dall'esposizione al cadmio, infatti alcuni esperimenti suggeriscono che la differente espressione della proteina

trasportatrice del zinco ZIP 8 nel topo potrebbe fornire la spiegazione biologica del perché il varicocele colpisce gli uomini diversamente [13].

5. Specie reattive dell'ossigeno (ROS). Sono necessarie per la normale funzione spermatica in quanto rappresentano un segnale di trasduzione intracellulare per facilitare la capacitazione degli spermatozoi [14]. In condizioni fisiologiche esiste un equilibrio fra la produzione e l'eliminazione di queste molecole, tuttavia alcune condizioni patologiche possono produrre un eccesso di ROS, i quali causano la perossidazione dei lipidi di membrana alterando la morfologia e la vitalità degli spermatozoi. Prove sperimentali mostrano, però, che la somministrazione di antiossidanti, come il glutatione e la carnitina, riesce a migliorare i parametri seminali in soggetti che presentano varicocele suggerendo così l'importanza dei ROS nella fisiopatologia di questo disturbo [15].

- *Ipogonadismo endocrino*. L'alterazione della precisa coordinazione tra gli elementi costituenti dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolare può portare all'infertilità a causa della ridotta produzione di spermatozoi, soprattutto nel caso in cui l'ipofisi non possa secernere le gonadotropine in quantità sufficiente. Questo deficit ormonale viene identificato con il termine ipogonadismo ed è distinto in tre tipologie:

1. Nell'ipogonadismo primitivo, o ipergonadotropo, la funzionalità delle cellule di Leydig è compromessa e ciò può danneggiare la produzione di testosterone o alterare i tubuli seminiferi provocando oligospermia o azospermia e aumento delle gonadotropine.
2. Nell'ipogonadismo secondario, o ipogonadotropo, e terziario, rispettivamente i danni all'ipofisi e all'ipotalamo causano una minore secrezione di gonadotropine, provocando così impotenza e sterilità.
3. Nel caso in cui ci sia resistenza agli androgeni, la risposta alla stimolazione ormonale risulta inadeguata.

L'indagine clinica si svolge a tre livelli: innanzitutto si deve considerare se i livelli di testosterone del paziente risultano alterati, poi bisogna ricercare l'eziologia dell'anormalità eventualmente presente e infine è necessario definire una terapia ormonale che possa modificare lo stato di infertilità [17]. Il dosaggio plasmatico di FSH (ormone follicolo-stimolante) è il parametro più importante e significativo per valutare la funzione tubolare, poiché proprio il rilascio di quest'ormone da parte dell'ipofisi



stimola nell' uomo la produzione di spermatozoi; tuttavia anche i dosaggi di altri ormoni, come LH (ormone luteinizzante), testosterone e prolattina possono essere utili nella diagnosi di ipogonadismo, in particolare i livelli plasmatici di FSH e LH consentono di distinguere l'ipogonadismo ipergonadotropo da quello ipogonadotropo.

La terapia sostitutiva con somministrazione di androgeni viene effettuata sia nel caso di ipogonadismo primitivo sia nel caso di ipogonadismo secondario, anche se in presenza di ipogonadismo primitivo non ha effetti sulla spermatogenesi [18].

- *Disfunzioni di emissione e /o funzionalità degli spermatozoi.* Il termine disfunzioni comprende una serie di problemi fisici o psicologici che comportano alterazioni dell'erezione o della frequenza dei rapporti sessuali sufficiente a impedire il deposito del liquido seminale all' interno della vagina e rappresentano circa l'1% delle cause di infertilità maschile (Fertility Problems clinics, Western General Hospital, Edimburgh). Esse dipendono dalla presenza di anomalie congenite, quali il micropene, l'ipospadia e l'epispadia; questi ultimi sono caratterizzati dallo sbocco dell'uretra rispettivamente sulla faccia inferiore e superiore del pene anziché all'estremità come di norma e comportano difficoltà nell'emissione degli spermatozoi. Le disfunzioni di emissione degli spermatozoi sono anche acquisite, come nel caso della cicatrizzazione del frenulo, di traumi o della fimosi, la quale comporta un'eccessiva ristrettezza dello sbocco del prepuzio.

Inoltre, la presenza di disfunzioni può influenzare l'eiaculazione o l'erezione. Le anomalie legate all'eiaculazione comprendono l'aneiaculazione, l'eiaculazione retrograda e altri disturbi psicologici o fisici che possono portare alla liberazione degli spermatozoi fuori dalla vagina. L'aneiaculazione è un disturbo raro caratterizzato dall'impossibilità patologica di eiaculare talvolta associata a problemi a livello del midollo spinale. Più frequente è l'eiaculazione retrograda che può essere congenita oppure acquisita in seguito a una frattura del bacino o a un intervento di chirurgia urologica. I difetti erettivi possono dipendere, invece, da un'insufficienza nello sviluppo del pene o nella rigidità di erezione e dalla deformità dell'erezione che potrebbe impedire la penetrazione [3].

Una delle anomalie più frequenti dell'apparato urogenitale maschile è il criptorchidismo, definito come la mancata discesa di uno (criptorchidismo

monolaterale, lievemente più frequente sul lato destro) o di entrambi i testicoli (criptorchidismo bilaterale) nella borsa scrotale. Il testicolo colpito dalla disfunzione è trattenuto in un punto qualsiasi del tragitto che normalmente esso compie durante lo sviluppo embrionale, attraverso il canale inguinale, dalla parte inferiore del rene allo scroto ma in circa la metà dei bambini criptorchidi esso discende spontaneamente nello scroto entro il primo anno di vita. I testicoli colpiti da criptorchidismo si distinguono in base alla loro posizione nella via inguinale (addominale alta e bassa, inguinale, soprascrotale e scrotale alta), perciò si riconoscono testicoli retrattili, ritenuti ed ectopici. La presenza di criptorchidismo aumenta il rischio di sviluppare un tumore del testicolo di circa 10-20 volte. Ciò dipende principalmente dall'aumento della temperatura del testicolo, la quale causa la differenziazione di cellule germinali anomale e l'alterazione della sintesi endocrina [19].

Il criptorchidismo è presente nella manifestazione clinica di numerose patologie con anomalie cromosomiche ma anche in altre con eziologia non cromosomica. In genere si tratta di sindromi rare e piuttosto gravi tra le quali si ascrivono le uropatie malformative, le sindromi malformative complesse conseguenti a deficit ormonali per alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisario-gonadico e l'alterata sintesi di androgeni [20]; frequente è infine l'associazione tra il criptorchidismo e le anomalie dei cromosomi sessuali come le sindromi di Klinefelter, di Noonan e di Kallmann, oppure degli autosomi come la sindrome di Prader-Willy e le trisomie dei cromosomi 13, 18 e 21 [21].

- *Cancro testicolare*. Secondo l'AIRC (Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro) i tumori al testicolo rappresentano circa l'1% di tutti i tumori maschili e il 30% dei tumori dell'uomo giovane [22]. Questo, come altri tumori, può compromettere la qualità del liquido seminale anche prima dell'inizio di qualsiasi trattamento, ad esempio si stima che il 40% degli uomini con linfoma di Hodgkin e il 50% dei soggetti colpiti da cancro testicolare producono una quantità molto bassa di spermatozoi.

I trattamenti, come la chemioterapia e la radioterapia, alterano la funzione riproduttiva direttamente causando dei danni ai testicoli oppure indirettamente danneggiando l'attività dell'asse ipotalamo-pituitario [23], infatti si stima che soggetti sottoposti a trattamenti per la cura del cancro presentino una probabilità dimezzata rispetto ai loro fratelli di ottenere una gravidanza e che meno del 20% di essi osservi un miglioramento

a livello della spermatogenesi da 37 a 48 mesi dopo il trattamento [24]. L'infertilità permanente, dopo una terapia per il cancro, è dovuta alla perdita delle cellule staminali: l'epitelio germinale è molto sensibile alle radiazioni e alle sostanze chemioterapiche, soprattutto agli agenti alchilanti, come la procarbazina e la vinblastina, che causano un danno diretto al DNA e all'RNA inducendo l'apoptosi [25]. Anche le cellule di Leydig sembrano essere abbastanza sensibili alla maggior parte dei regimi chemioterapici [26]. In caso di radioterapia l'area del corpo sottoposta alle radiazioni viene stabilita in base alla tipologia e alla dimensione del cancro: il danno primario ai testicoli si ha quando la radioterapia è mirata ai testicoli o ad aree vicine poiché gli spermatogoni risultano essere molto sensibili agli effetti delle radiazioni e anche dosaggi bassi possono causare danni irreversibili, il danno secondario, detto fallimento testicolare, invece può sopraggiungere quando il bersaglio della radioterapia è il cervello, dato che ciò può determinare delle lesioni a livello ipofisario e, di conseguenza, compromettere il rilascio degli ormoni per la funzione riproduttiva.

- *Anomalie cromosomiche/geniche.* I difetti genetici che possono causare infertilità comprendono sia le aneuploidie, cioè le alterazioni del numero dei cromosomi, sia i difetti strutturali, come traslocazioni, inversioni, duplicazioni e delezioni; esempi molto significativi sono la mutazione a carico del gene regolatore della fibrosi cistica (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance, CFTR) e le microdelezioni nel locus DAZ del cromosoma Y che possono provocare un'agenesia congenita bilaterale dei dotti deferenti e della vescicole seminali [3]. Tra le aneuploidie la sindrome di Klinefelter rappresenta la causa più frequente di ipogonadismo maschile, infatti si presenta in una percentuale di 0,15-0,2% di soggetti, equivalente a circa uno su 700 nati vivi. Si tratta della trisomia XXY dovuta, nella maggior parte dei casi, alla non disgiunzione di uno dei cromosomi X dell'oocita e comporta, come principali conseguenze, la riduzione della produzione di testosterone e l'azoospermia. La patologia può presentarsi, comunque, in diverse forme mosaicistiche, perciò le sue manifestazioni variano proporzionalmente al danno testicolare; i sintomi più comuni sono rappresentati da disarmonie scheletriche, riduzione di peli pubici e corporei, rallentamento della crescita della barba e della forza muscolare, ginecomastia e riduzione della libido e della potenza. La sindrome di Klinefelter è una disgenesia, cioè rappresenta una condizione di

intersessualità in cui esiste sempre un conflitto tra sesso cromosomico, gonadico e fenotipico, a livello dell'apparato genitale interno o esterno o di ambedue. Si distinguono, infine, anomalie minori che emergono solitamente quando i sistemi di riparazione del DNA delle cellule germinali non sono in grado di correggere le alterazioni [27] e ciò può verificarsi in seguito a danni ossidativi, dovuti a loro volta a diversi fattori legati al testicolo, al tratto genitale o alle condizioni ambientali.

- *Stile di vita.* Le abitudini che interagiscono negativamente sulla fertilità maschile comprendono l'alcool (più di sei unità al giorno), il fumo (più di dieci sigarette al giorno), l'alimentazione e l'apporto di alcuni sottogruppi di acidi grassi essenziali, la consuetudine di fare bagni caldi, i vestiti stretti e lo stress elevato. I lavoratori impiegati in determinati settori rischiano l'infertilità a causa dell'esposizione a sostanze tossiche come i metalli pesanti, il disolfuro di carbonio o i benzeni ma anche l'esposizione a un ambiente ad alta temperatura e l'assunzione involontaria di sostanze ambientali in grado di influenzare l'equilibrio ormonale, come gli xeno-estrogeni e gli anti-androgeni, possono annullare la spermatogenesi [3]. Infine, anche l'uso di droghe illegali può essere una delle cause più importanti di infertilità maschile; tra queste sostanze è molto pericolosa soprattutto l'assunzione di steroidi androgeni anabolizzanti (AAS), marijuana, oppioidi narcotici, cocaina e metanfetamine perché provoca effetti avversi sull'asse ipotalamo-pituitaria-testicolare, sull'attività spermatica e sulla struttura testicolare. In letteratura le prove che confermano un potenziale impatto negativo delle droghe illegali sulla fertilità maschile sono limitate, tuttavia diversi studi ben progettati sono tuttora in corso per chiarire meglio la relazione tra l'assunzione di queste sostanze e il loro effetto sulla fertilità maschile [28].
- *Sterilità idiopatica o inspiegata.* Si definisce tale quando, nonostante tutte le indagini diagnostiche eseguite, non si è identificata la causa dell'infertilità.

## **1.2 Le tecniche di cura dell'infertilità**

Quando non è possibile intervenire con terapie semplici, per ripristinare uno stato di potenziale fertilità, è utile ricorrere alle tecniche di fecondazione medicalmente assistita: i casi più frequenti sono quelli che presentano una concentrazione di spermatozoi nel liquido seminale estremamente ridotta e non suscettibile a terapia o livelli di ostruzione delle vie seminali che impongono il prelievo degli spermatozoi direttamente dal testicolo.

La maggior parte delle coppie infertili si rivolge ai centri specializzati di Fecondazione Medicalmente Assistita (PMA), infatti nelle Relazioni del Ministero della Salute negli anni 2005-2011 si evidenzia che il numero di coppie sottoposte a tecniche di PMA è passato dalle 17.125 del 2003 alle 63.840 del 2009.

Le tecniche di PMA attuabili sono diverse e vengono applicate in relazione alle esigenze della coppia; generalmente si distinguono tecniche di I livello, semplici e poco invasive, e tecniche di II e III livello, complesse e più invasive.

Per inseminazione artificiale si intende prevalentemente l' inseminazione intrauterina (IUI), una tecnica di I livello che consiste nell'introduzione del liquido seminale, opportunamente trattato, all'interno della cavità uterina. Questa pratica è consigliata nei casi di sterilità idiopatica, di infertilità maschile di grado lieve-moderato e di incompatibilità fra muco e spermatozoi perché permette di superare il tratto cervicale e di immettere gli spermatozoi direttamente in utero, ma viene utilizzata anche quando il paziente è affetto da patologie sessuali che rendono difficile un rapporto completo oppure quando la ripetuta induzione di gravidanza mediante stimolazione dell'ovulazione e i rapporti mirati, cioè rapporti che si hanno durante i giorni della probabile ovulazione, hanno avuto esito negativo. Per effettuare un'inseminazione intrauterina bisogna innanzitutto monitorare un ciclo spontaneo dell'ovulazione oppure indurre farmacologicamente una superovulazione, monitorando mediante ecografia e/o dosaggi ormonali la crescita follicolare, in seguito, raggiunta la maturazione ovocitaria, si potrà introdurre il liquido seminale preparato adeguatamente.

Le tecniche di II e III livello prevedono che l'incontro tra i gameti avvenga all'esterno del corpo femminile. La fecondazione in vitro e il trasferimento dell' embrione (FIVET)

prevede il prelievo degli ovociti, pick up, per via trans vaginale sotto controllo ecografico in seguito a un'induzione farmacologica dell'ovulazione; ciò consente di scegliere gli ovociti idonei all'incontro con gli spermatozoi derivati da un campione trattato o crioconservato. A questo punto si effettua l'unione tra i due gameti e, avendo accertato l'avvenuta fecondazione di ogni oocita, può aver luogo il trasferimento degli embrioni in utero. Si riconoscono parecchi casi in cui è consigliabile effettuare una FIVET tra cui, soprattutto, il fallimento delle tecniche di I livello; anche casi di patologia tubarica acquisita, di endometriosi di III e di IV grado e di infertilità idiopatica possono trovare una soluzione con l'applicazione di questa tecnica.

Il trasferimento intratubarico di gameti (GIFT) è una procedura utilizzata, ormai, raramente e viene effettuata prevalentemente su quelle coppie che vogliono evitare una tecnica extracorporea ma su cui non è possibile agire con una IUI. Consiste nel prelievo degli ovociti per via transvaginale ecoguidata o per via laparoscopica e nel successivo trasferimento dei gameti per via transvaginale o laparoscopica all'interno delle tube.

Il trasferimento intratubarico di zigoti ed embrioni (ZIFT-TET) è una tecnica quasi del tutto inutilizzata oggi. Prevede il prelievo degli ovociti per viatransvaginale eco guidata, la fecondazione in vitro e, infine, il trasferimento degli zigoti o degli embrioni per via laparoscopica.

La microiniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) è una metodica utilizzata, generalmente, in associazione alla FIVET. Consiste appunto nell'iniezione di un singolo spermatozoo nel citoplasma ovocitario e nel trasferimento dell'embrione nell'utero dopo che la fecondazione è stata accertata. Inizialmente viene eseguita un'induzione della crescita follicolare e della maturazione degli ovociti mediante la somministrazione di farmaci induttori dell'ovulazione, poi, con un pick up sotto controllo ecografico, vengono prelevati gli ovociti e preparati per l'inseminazione. Il liquido seminale subisce un trattamento specifico e viene ottenuto solitamente per masturbazione; questa procedura può essere eseguita anche su pazienti azoospermici grazie alla possibilità di prelevare gli spermatozoi applicando tecniche chirurgiche come l'aspirazione percutanea di spermatozoi per via testicolare (TESA), l'estrazione di spermatozoi per via testicolare (TESE), l'aspirazione microchirurgica di spermatozoi dall'epididimo (MESA) e l'aspirazione percutanea di spermatozoi dall'epididimo (PESA). Oltre che, come già detto, nei casi di azoospermia ostruttiva e secretiva, la ICSI

si rivela utile nei soggetti con infertilità di grado elevato o con un ridotto numero di ovociti e nei casi di mancata o ridotta fertilizzazione nelle FIVET precedenti. Inoltre questa tecnica concede la possibilità di utilizzare gameti crioconservati.

La biologia della riproduzione ha dato un contributo notevole alla cura della sterilità, in particolare la ICSI ha consentito di raggiungere l'obiettivo della gravidanza con l'iniezione di un singolo spermatozoo e, per questo, è diventata la tecnica maggiormente utilizzata nei centri che si occupano di PMA. Come discusso precedentemente, la ICSI permette di impiegare spermatozoi crioconservati in modo tale da poter eseguire l'inseminazione, in base a indicazioni specifiche, anche molto tempo dopo che il liquido seminale è stato prodotto o che il prelievo di spermatozoi dall'epididimo o dal testicolo è stato attuato [29].

## 2 La crioconservazione

### 2.1 Origine e biofisica della crioconservazione

La crioconservazione è la branca della criobiologia che consente il mantenimento della vita cellulare durante un intervallo più o meno lungo di congelamento: le cellule vengono sospese in una soluzione salina ed entrano a contatto con composti organici a basso peso molecolare che le proteggono durante il congelamento a temperature molto basse, al di sotto dello zero; a queste temperature estreme i processi biochimici del metabolismo cellulare vengono interrotti poiché il movimento molecolare si arresta.

Quando poi la soluzione contenente le cellule verrà riscaldata, esse potranno recuperare le loro normali funzioni; tuttavia questo processo deve tener conto delle lesioni strutturali o biochimiche che potrebbero causare la morte cellulare.

La prima osservazione sulla possibilità di conservare le cellule, raffreddandole sulla neve, è stata realizzata da Lazzaro Spallanzani nel 1776; da allora parecchi studi si sono concentrati sul mantenimento della vitalità cellulare. Nel 1936 Jahnel ha sperimentato per primo la sopravvivenza di spermatozoi animali in elio a  $-269,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  e ha scoperto che alla temperatura di  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  essi potevano essere conservati fino a 40 giorni.

La chiave del successo della crioconservazione è evitare la formazione di ghiaccio all'interno della cellula (Luyet, anni '30), perciò, a questo scopo, una delle innovazioni principali nello sviluppo della crioconservazione del liquido seminale, sebbene casuale, è stata l'aggiunta di glicerolo, in grado di proteggere le cellule dalle lesioni provocate dal freddo, come dimostrato da Christopher Polge e dai suoi collaboratori nel 1949.

Negli anni '50 la crioconservazione riguardava ancora soltanto gli animali, soprattutto i tori, e veniva praticata principalmente al fine di:

- ❖ Incrementare le nascite con il minimo dei costi per l'industria zootecnica;
- ❖ Selezionare prodotti di ottima qualità;
- ❖ Salvare razze in via d'estinzione.



Negli anni successivi Sherman ha ottenuto la prima gravidanza da spermatozoi conservati in ghiaccio secco a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  e ha fondato nel 1962 la prima banca del seme nella quale gli spermatozoi venivano crioconservati secondo la tecnica di congelamento in azoto liquido e glicerolo al 10%; solo in seguito si è passati all'aggiunta di tuorlo d'uovo, glucosio e citrato nel mezzo di crioprotezione (Berman e Sawada).

Oggi le banche del seme sono molto diffuse, soprattutto nei numerosi centri che si occupano di PMA, e consentono di ottenere una gravidanza anche molto tempo dopo il prelievo dei gameti, infatti il periodo più lungo di crioconservazione che ha dato esito ad una nascita dopo un'inseminazione artificiale omologa (AIH) è di quindici anni e nove mesi (J.H. Olson comunicazione personale); ciò rende la crioconservazione del seme un procedimento sicuro nel mantenimento del potenziale riproduttivo degli spermatozoi durante una conservazione in azoto liquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  per un tempo indefinito.

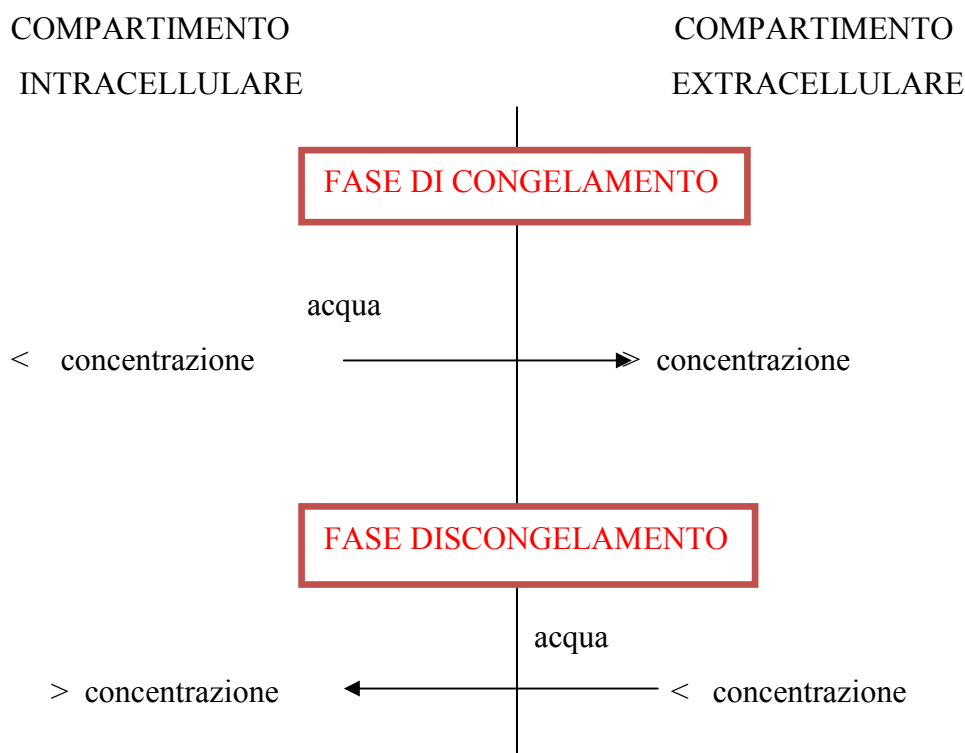
Oggi è possibile conservare in azoto liquido sia il liquido seminale, prodotto dal paziente mediante masturbazione, sia il tessuto testicolare, all'interno del quale gli spermatozoi si differenziano, prelevato con tecniche bioptiche; in quest'ultimo caso il processo di crioconservazione può risultare più difficoltoso poiché il tessuto va incontro alla perdita di adesione tra le cellule e le molecole d'acqua rimangono intrappolate nei tubuli provocando la formazione di cristalli di ghiaccio, inoltre un'ulteriore complessità per il meccanismo di congelamento del tessuto testicolare è data dalla presenza di diverse tipologie cellulari al suo interno.

La crioconservazione è un processo molto complesso e, proprio per questo, è influenzato da fattori diversi. Quando si decide di congelare delle cellule si deve innanzitutto considerare che i differenti tipi cellulari reagiscono in modo diverso al contatto con il freddo, perciò va stabilita con cura la temperatura e il tempo di permanenza del mezzo di crioconservazione. Un altro punto su cui ci si deve concentrare riguarda la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno della cellula che limita enormemente la percentuale di cellule in grado di sopravvivere al congelamento perché potrebbe provocare lesioni alla membrana plasmatica fino a causarne la rottura. Per evitare questo molti protocolli prevedono la fase di seeding, cioè il congelamento del mezzo extracellulare indotto mediante un brusco abbassamento della temperatura; ciò viene, di solito, provocato toccando il contenitore contenente il campione con un

piccolo oggetto, ad esempio una pinza, che si trovi a una temperatura minore. In questo modo si cerca di interferire con il superaffreddamento dell'acqua, cioè con la sua capacità di raffreddarsi al di sotto del proprio punto di congelamento senza cambiare stato al fine di provocare la disidratazione cellulare indotta per proteggere le cellule dalla possibile formazione di ghiaccio al loro interno che potrebbe causarne la morte [30].

Il mezzo in cui sono sospese le cellule presenta un punto di congelamento vicino ai  $-10^{\circ}\text{C}/-15^{\circ}\text{C}$ , quindi al di sotto degli  $0^{\circ}\text{C}$ , punto di congelamento dell'acqua pura, perché contiene soluti. A queste temperature l'acqua contenuta nel mezzo extracellulare solidifica aumentando ulteriormente la concentrazione di soluti in essa disciolti e ciò produce una certa pressione osmotica che innesca il flusso di solvente attraverso la membrana semi-permeabile dall'interno delle cellule, dove la concentrazione di soluti è minore, al suo esterno. Durante lo scongelamento si verifica il processo osmotico inverso, infatti non appena l'acqua passa dallo stato solido allo stato liquido la concentrazione di soluti nel mezzo extracellulare si riduce progressivamente e le cellule si idratano nuovamente per compensare la differenza di concentrazione tra il compartimento extracellulare e quello intracellulare. Inoltre la membrana plasmatica subisce variazioni della permeabilità perché i lipidi e le proteine che la compongono vanno incontro a riarrangiamenti strutturali [31].

Lo spostamento dell'acqua dal comparto intracellulare a quello extracellulare secondo i gradienti di osmolarità è schematizzato nella Figura 1.



**Figura 1. Illustrazione del movimento dell'acqua dal comparto intracellulare a quello extracellulare e viceversa durante le fasi di congelamento e scongelamento.**

## **2.2 Strumenti della crioconservazione**

Quando si vuole congelare un campione seminale si deve ricorrere all'utilizzo di dispositivi idonei alle temperature estreme alle quali la crioconservazione viene effettuata. Sono conosciute diverse attrezzature in commercio:

- Ampolle. Tra i primi sistemi di stoccaggio ad essere utilizzati, sono delle fiale di vetro capaci di contenere 1-1,5 ml di liquido seminale già diluito. Oggi sono adoperate raramente a causa della loro fragilità ma anche perché non garantiscono una temperatura uniforme al loro interno, infatti le cellule che si trovano nelle zone più interne

presentano una temperatura diversa rispetto a quelle che sono localizzate vicino alle pareti.

- Paillettes. Le più utilizzate hanno una capacità di 0,25-0,5ml e sono state ideate da Cassou [32]. Sebbene inizialmente fossero realizzate in cloruro di polivinile (PVC), oggi viene principalmente impiegato il glicole polietilenico tereftalato (PETG) per la loro costruzione perché questo non subisce alterazioni della sua integrità meccanica quando viene sterilizzato con l'utilizzo di radiazioni. Le paillettes vengono caricate manualmente, mediante siringhe graduate da 1ml, oppure automaticamente, attraverso una pompa ad aspirazione continua. Dopo essere state riempite le paillettes vengono sigillate con tappi di resina polimerica o tramite termosaldatura ad entrambe le estremità.
- Cryovials. Sono delle provette realizzate con polipropilene dotate di un tappo a vite, anch'esso costituito da polipropilene o da polietilene, che è provvisto di un sigillo di silicone. Rappresentano uno fra gli strumenti di stoccaggio più utilizzati e generalmente vengono riempite manualmente.

Più recentemente, sono state realizzate delle provette per la crioconservazione costituite da una resina ionomerica che conferisce dei vantaggi sostanziali in termini di forza meccanica alle temperature molto basse e di resistenza ai virus; inoltre quando sono usate in associazione con dei dispositivi di saldatura termica, ad esempio il SYMS, esse riescono a mantenere una tenuta maggiore fino a pressioni pari a 150 kg/cm<sup>2</sup> [33].

## **2.3 Indicazioni per i pazienti**

La crioconservazione ha ottenuto, oggi, un posto di rilievo nella cura alla sterilità e sempre più coppie si rivolgono ai centri di PMA nella speranza di raggiungere una gravidanza; si è resa, quindi, indispensabile la stesura di linee guida che regolino la qualità dell'assistenza clinica al paziente.

L'utilizzo del seme di un donatore può prevenire la trasmissione di malattie ereditarie e infettive in una coppia eterosessuale ma è in grado anche di dare la possibilità di

inseminazione a donne single e/o omosessuali. In Italia la donazione di seme non è possibile, secondo quanto previsto dall' art. 4, comma 3, della legge 40/2004 “Norme in materia di riproduzione medicalmente assistita”, perciò la crioconservazione può essere solo omologa, cioè il paziente può crioconservare soltanto il proprio seme.

La crioconservazione omologa, o autoconservazione, viene solitamente effettuata “a carico precauzionale” in numerose occasioni:

- Pazienti con azoospermia secretiva o ostruttiva, nei quali gli spermatozoi vengono prelevati chirurgicamente, al fine di non ripetere il prelievo chirurgico ad ogni applicazione della tecnica di PMA.
- Soggetti sottoposti a vasectomia, un metodo contraccettivo che prevede l'asportazione, dopo legatura, dei canali deferenti, ossia i dotti che mettono in comunicazione i testicoli con la prostata, evitando che gli spermatozoi entrino a far parte del liquido seminale.
- Pazienti affetti da patologie che necessitano di terapie dannose per la spermatogenesi, come chemioterapia e radioterapia. La diagnosi di cancro, infatti, è spesso associata a un' alta probabilità di perdita della fertilità in seguito ai trattamenti a cui ci si deve sottoporre. Molti uomini con neoplasie testicolari o ematologiche presentano una subfertilità iniziale, infatti circa la metà di loro si rivolge alle banche del seme perché possiede meno di un milione di spermatozoi mobili, il 13,8% è azoospermico e il 2,6% è incapace a produrre il campione [34].
- Pazienti che hanno subito una biopsia al testicolo o all'epididimo sui quali, quindi, non sarà in seguito necessario intervenire chirurgicamente per il recupero degli spermatozoi. La crioconservazione del tessuto testicolare intatto è molto impegnativa a causa della perdita di adesione fra le cellule, dell'acqua che rimane all'interno dei tubuli e che forma dei cristalli di ghiaccio e delle differenti proprietà dei vari tipi di cellule che compongono il tessuto.
- Pazienti portatori di malattie infettive, il liquido seminale dei quali deve subire diverse fasi di lavaggio prima di poter essere crioconservato.
- Soggetti che presentano difficoltà nella raccolta del campione a causa, ad esempio, di eiaculazione retrograda, di disfunzione erettile, di problemi psicologici.
- Soggetti che non possono essere presenti il giorno in cui verrà effettuata la tecnica di fecondazione medicalmente assistita.

- Pazienti in cui si ha perdita progressiva della qualità del liquido seminale perché sono presenti microdelezioni del cromosoma Y o sono affetti da azoospermie transienti.
- Soggetti che, per motivi di lavoro, sono esposti a sostanze genotossiche.
- Pazienti affetti da patologie per cui sono necessari interventi chirurgici all'apparato urogenitale che possono ledere la funzione eiaculatoria.
- Pazienti criptorchidi, cioè individui in cui uno o entrambi i testicoli non sono discesi nel sacco scrotale alla nascita [35].

## 2.4 Danni dovuti al congelamento

Il limite principale riscontrato nelle tecniche di PMA con seme congelato è la ridotta motilità e la minore capacità fecondante degli spermatozoi allo scongelamento, infatti sia gli oociti che gli spermatozoi sembrano particolarmente suscettibili al danno provocato dalle basse temperature [30].

Durante il processo della crioconservazione le cellule sono esposte a numerosi fattori che possono ridurre la loro probabilità di sopravvivenza. Innanzitutto la temperatura. Le cellule di mammifero si sono evolute per sopravvivere all'interno di un range di temperature che varia tra i 35°C e i 40°C ma, sebbene possano tollerare una breve esposizione a temperature più basse, muoiono se vengono raffreddate e tenute per lungo tempo a temperature superiori a -130°C (temperatura di transizione vetrosa) poiché ciò potrebbe causare una ricristallizzazione, con formazione di cristalli di ghiaccio, potenzialmente dannosi per le cellule (Sherman, 1990; Keeb, Webster, 1993; Watson, 1995). La diversa sensibilità delle cellule al freddo dipende, in massima parte dagli effetti che questo ha sui lipidi di membrana e sulla concentrazione di calcio intracellulare. Nella membrana cellulare i lipidi possono esistere sia in uno stato rigido e ordinato, detto gel, sia in uno stato fluido, più flessibile e relativamente disordinato; la transizione da uno stato all'altro avviene a una temperatura definita dalla distribuzione degli acidi grassi che compongono la membrana. In genere i fosfolipidi di membrana hanno una temperatura di fusione compresa tra 0°C e 15°C ma la transizione non

avviene contemporaneamente in tutta la superficie cellulare, perciò si verificherà la presenza sincrona dei due stadi ad una data temperatura. Inoltre l'aumento di fluidità della membrana è associata a una maggiore permeabilità di quest'ultima ai soluti quali il calcio [36].

Anche la velocità con la quale la temperatura diminuisce dai valori fisiologici a valori al di sotto dello zero incide significativamente sulla probabilità di sopravvivenza della cellula e dipende strettamente dal tipo di cellula e dal suo volume iniziale. Questa variabile è definita cooling rate, e viene stabilita tenendo conto sia della velocità di raffreddamento, che deve essere bassa per evitare la formazione di cristalli di ghiaccio, sia del tempo di esposizione al crioprotettore, che non deve essere eccessivamente lungo per limitare i danni causati dallo stress osmotico. Infatti se il congelamento avviene troppo velocemente, la cellula non sarà in grado di disidratarsi completamente, e l'acqua rimasta al suo interno congelerà arrecando danno alla membrana plasmatica.

Lo stress osmotico è associato alla deformazione meccanica a cui è sottoposta la cellula a causa della riduzione della sua dimensione originata in seguito all'intenso processo di disidratazione e dalla prolungata esposizione della cellula ad alte concentrazioni di elettroliti; infatti, quando il volume cellulare diminuisce, per mezzo della disidratazione, durante la fase di congelamento, la pressione del contenuto citoplasmatico aumenta per contrastare la resistenza della cellula all'eccessiva perdita di volume ma, quando questa resistenza fisica supera un certo valore limite, la cellula subisce alterazioni irreversibili della propria permeabilità [36].

Lo scongelamento è anch'esso un evento critico del processo di crioconservazione ed è strettamente associato alle condizioni di congelamento. In generale se il raffreddamento lento viene interrotto a temperature relativamente elevate (  $-30^{\circ}\text{C}$ ,  $-40^{\circ}\text{C}$ ), nelle cellule rimane una certa quantità di acqua, per cui il riscaldamento deve essere rapido per evitare la cristallizzazione dell'acqua in cristalli di dimensioni maggiori che danneggerebbero le cellule. Se invece il congelamento lento continua fino a  $-80^{\circ}\text{C}$ , le cellule sono molto più disidratate e lo scongelamento deve avvenire molto più lentamente per permettere un'adeguata reidratazione.

Il warming rate, corrisponde alla velocità alla quale la temperatura aumenta durante la fase di scongelamento e tiene conto sia della velocità con la quale il crioprotettore viene rimosso sia dell'aumento di temperatura.

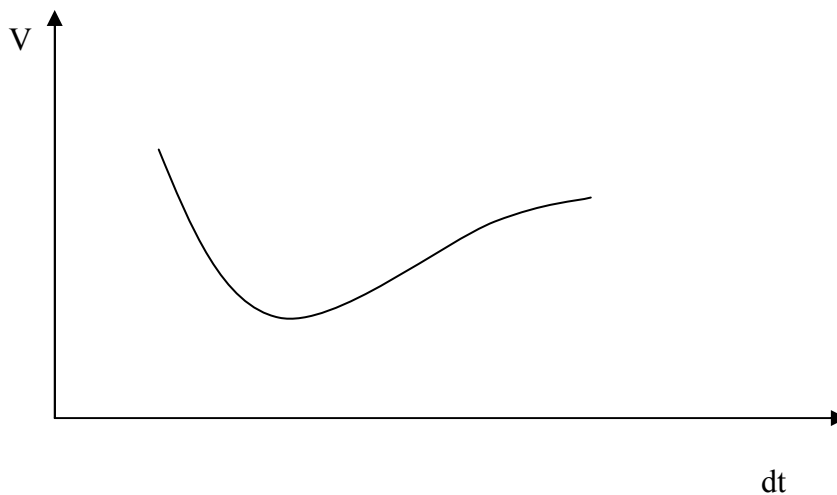
Il cooling rate ideale per ogni tipo di cellula può essere determinato grazie all'equazione differenziale descritta da Mazur [52].

$$T e^{b(T_g - T)} \frac{d^2V}{dT^2} - \left[ (bT + 1) e^{b(T_g - T)} - \frac{ARk_g n_2}{B(V + n_2 v_1^0)} \times \frac{T^2}{V} \right] \frac{dV}{dT} = \frac{Ak_g L_f}{B v_1^0}$$

L'equazione riportata tiene conto del rapporto superficie-volume, della permeabilità di membrana all'acqua, della quantità di soluti all'interno e all'esterno della cellula e del coefficiente di temperatura e permette di costruire una curva di raffreddamento mettendo in relazione la diminuzione di volume cellulare, dovuta al congelamento, e la temperatura.

Infine possiede una certa importanza il terreno nel quale le cellule sono sospese quando vengono raffreddate fino a raggiungere temperature sotto lo zero.

Nella Figura 2 si evidenzia la correlazione tra la variazione di volume cui è sottoposta una cellula, e il tempo di esposizione al crioprotettore [52].



**Figura 2.**



Mediamente, solo il 50% degli spermatozoi mobili sopravvive al processo di crioconservazione e allo scongelamento (Keel, Webster, 1993), quindi la ricerca è concentrata sull'ottimizzazione dei protocolli di crioconservazione al fine di ridurre i danni dovuti al congelamento ed aumentare contemporaneamente i tassi di gravidanza (Wood et al., 2004).

## **2.5 I crioprotettori**

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 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%).

Per proteggere gli spermatozoi dai danni a cui sono soggetti durante il processo di congelamento/scongelamento si ricorre all'aggiunta di diverse sostanze nel mezzo contenente il campione. Le proprietà protettive di questi composti sono state scoperte casualmente, nel 1949, da Christopher Polge [37] che, aggiungendo il 10% di glicerolo ad una sospensione di spermatozoi di pollo e congelando il campione a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ha osservato che quasi tutte le cellule mostravano livelli di motilità nella norma quando venivano scongelate; successivamente lo stesso Polge ha dimostrato che anche gli spermatozoi di toro erano in grado di fecondare oociti in una AIH dopo essere stati crioconservati. Nella loro prima pubblicazione su questo oggetto, avvenuta su Nature nel 1949, Polge e colleghi hanno inoltre notato che, in aggiunta al glicerolo, il glicol etilene e altri composti neutri sono capaci di proteggere gli spermatozoi e numerosi altri tipi di cellule dai danni dovuti al congelamento. In particolare, tra questi il dimetilsolfossido (DMSO) presenta una temperatura di congelamento pari a  $-18,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,

perciò riduce il punto di solidificazione del mezzo contenente le cellule fino a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; ciò permette alla soluzione di rimanere fluida alle temperature estreme alle quali avviene la crioconservazione e, di conseguenza, rende il DMSO un ottimo additivo agli agenti crioprotettori [38].

L'anno seguente, Bunge e Sherman hanno utilizzato la stessa tecnica per gli spermatozoi umani ottenendo quattro gravidanze in donne fecondate con seme crioconservato [39].

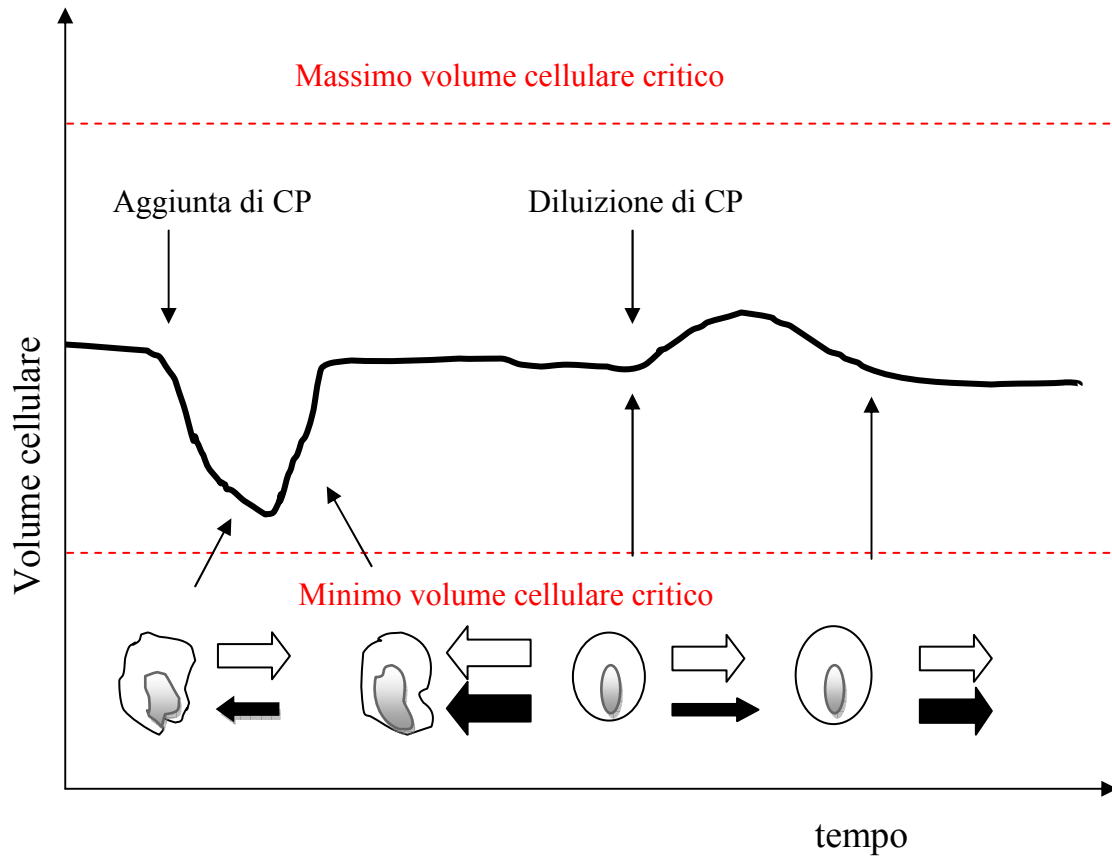
Per mantenere la vitalità e la motilità cellulare dopo il congelamento i crioprotettori devono:

- Agire attraverso la rottura dei legami a idrogeno nelle molecole d'acqua all'interno della cellula;
- Ridurre la temperatura di congelamento della soluzione, permettendo una maggiore disidratazione delle cellule;
- Interagire con le membrane cellulari durante il passaggio dallo stato fluido allo stato solido;
- Penetrare all'interno della cellula e indurre la fuoriuscita dell'acqua, riducendo la formazione di cristalli di ghiaccio.

Il meccanismo d'azione dei crioprotettori agisce, quindi, attraverso delle tappe specifiche per promuovere la sopravvivenza delle cellule al processo di congelamento; innanzitutto gli elettroliti presenti nel citoplasma vengono diluiti, poi la concentrazione di acqua all'interno della cellula diminuisce causando l'aumento della viscosità citoplasmatica e infine il crioprotettore stabilizza la membrana plasmatica grazie alla formazione di interazioni elettrostatiche.

Il mezzo in cui vengono conservate le cellule può alterare la funzionalità delle proteine di membrana quando è presente a concentrazioni eccessivamente elevate [40]. In aggiunta l'esposizione al crioprotettore esercita uno stress osmotico sulle cellule poiché incrementa l'osmolarità del mezzo, difatti quando la cellula inizialmente si disidrata per compensare la pressione osmotica, il crioprotettore penetra al suo interno ripristinando il suo originale volume isotonic; però quando il crioprotettore viene rimosso mediante diluizione, dopo lo scongelamento, la velocità con la quale l'acqua entra all'interno

della cellula, spinta dal gradiente osmotico, è maggiore rispetto al flusso che spinge il crioprotettore all'esterno e questo ristabilisce l'equilibrio fra i compartimenti intracellulare ed extracellulare. La cellula subisce delle lesioni irreversibili quando le escursioni di volume sono elevate ed eccedono i limiti di volume critico maggiore e minore della cellula, cioè quando il volume massimo o minimo che può consentire alla cellula di sopravvivere viene oltrepassato [33], Figura 3.



LEGENDA:

□ H<sub>2</sub>O

■ CPA (crioprotettore)

**Figura 3. Variazione del volume cellulare durante le fasi di preparazione al congelamento e successivo scongelamento [33].**

I crioprotettori (CP) possono essere suddivisi in due principali categorie in base alla loro capacità di attraversare la membrana plasmatica. I crioprotettori permeanti, o intracellulari, sono, per la maggior parte, polialcol come il metanolo, l'etanolo, il propandiolo, il glicerolo, il DMSO, l'acetabolo e, quindi sono molecole a basso peso molecolare e miscibili in acqua in tutte le proporzioni [31].

Il glicerolo è il migliore crioprotettore noto ed è il composto più utilizzato per il congelamento degli spermatozoi umani ma anche per le blastocisti e le altre piccole cellule. Non è tossico perché normalmente prodotto come metabolita dall'organismo ed ha un comportamento duplice, infatti in base alla temperatura, può comportarsi da crioprotettore intracellulare oppure extracellulare. Esso permette anche il congelamento di spermatozoi di scarsa qualità ma, se usato da solo, può compromettere la sopravvivenza delle cellule e danneggiare la membrana e l'acrosoma. Come ha dimostrato Sherman nei suoi studi, infatti, l'utilizzo di solo glicerolo come crioprotettore può provocare alterazioni della membrana, dei mitocondri e della guaina mitocondriale e disorganizzazione delle creste mitocondriali, del nucleo e della membrana interna dell'acrosoma che, quindi non risulta più parallela a quella esterna [41].

Ciò ha portato all'utilizzo delle altre sostanze protettive quali il propandiolo, che viene largamente utilizzato per gli embrioni umani ma possiede un numero limitato di applicazioni per quanto riguarda gli spermatozoi e il DMSO, che è impiegato non solo per i gameti ma anche per congelare altri tipi cellulari, come le cellule midollari; esso dovrebbe essere usato, però, solamente a 0 °C poiché a temperature superiori possiede effetti deleteri sugli spermatozoi umani e li espone allo shock dovuto al freddo.

I crioprotettori non permeanti, o extracellulari, non riescono ad attraversare la membrana plasmatica e hanno efficacia maggiore quando impiegati nei processi di congelamento ultra-rapido. Queste molecole agiscono promuovendo la rapida disidratazione cellulare e sono generalmente utilizzate in associazione con i crioprotettori intracellulari, perciò sono considerati maggiormente come additivi. Alcuni hanno basso peso molecolare mentre altri hanno un peso molecolare maggiore di 50.000

Da (polivinilpirrolidone, polivinil alcool, amido idrossietilico, ialuronato di sodio e altri polimeri) [35]. Presentano differente natura chimica e, in base a questa, hanno funzioni diverse: ad esempio gli zuccheri, come il saccarosio, il glucosio, il trealosio, possono aumentare l'osmolarità del mezzo e fornire energia agli spermatozoi in seguito alla loro ossidazione.

Le due classi di CP si distinguono per il ruolo diverso che ricoprono nel meccanismo di crioconservazione. Infatti i CP permeanti sono sempre necessari poiché, prima del congelamento, sostituiscono l'acqua all'interno della cellula e durante il processo, riducono la variazione del volume cellulare e la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno della cellula quando la velocità di congelamento è bassa. I CP non permeanti a basso peso molecolare, invece, combinati ai CP del primo gruppo, favoriscono la disidratazione cellulare contribuendo così ad evitare la formazione di ghiaccio. Infine, i CP non permeanti ad alto peso molecolare proteggono le cellule durante le fasi critiche di congelamento e scongelamento modificando la grandezza dei cristalli di ghiaccio così da renderli innocui.

Le soluzioni utilizzate per la crioconservazione del seme spesso sono arricchite dall'aggiunta di altri componenti che migliorano il rendimento dell'intero processo. Varie sostanze, come il latte e l'albumina, possono interagire con la membrana plasmatica e modificare la sua composizione lipidica per migliorarne la fluidità; tra queste il tuorlo d'uovo di gallina riesce anche a riparare la membrana scambiando acidi grassi con la membrana stessa e regola la concentrazione intracellulare di calcio evitando il suo accumulo dovuto al freddo, quindi protegge la membrana sia dal punto di vista strutturale sia dal punto di vista funzionale [42]. Altre sostanze, come la metil- $\beta$ -ciclodestrina, e i composti anfipatici (glicina, betaina, prolina), interagendo con i lipidi di membrana, alterano il loro livello di idratazione e il loro comportamento nello stato di transizione dalla fase fluida alle fase solida [43].

Agenti chelanti, quali l'acido tetracetico etilenediamide (EDTA) e il citrato, esercitano effetti benefici sul controllo della concentrazione di calcio intracellulare perché, interagendo con esso, possono diminuire il passaggio dello ione attraverso il doppio strato lipidico. Inoltre l'EDTA e altri chelanti possono inibire la perossidazione lipidica della membrana. Questo evento è causato dai radicali liberi dell'ossigeno e può essere evitato aggiungendo sostanze antiossidanti come l'idrotoluene butilato, il glutatione e il

ditiotreitolo che riescono anche a migliorare la motilità post-congelamento e l'integrità acrosomiale.

Nel terreno di crioconservazione vengono aggiunti inoltre dei tamponi che mantengono un pH fisiologico compreso tra 7,2 e 7,4 e garantiscono così la sopravvivenza delle cellule; i più usati sono la glicina, il sodio citrato, il triidrossimetilaminometano (TRIS) e i composti zwitterionici, come l'acido *N*-2-idrossietilpiperazina-*N'*-2-etansolfonico (HEPES) e l'acido *N*-triidrossimetil-2-aminoetansolfonico (TES). Il PBS non è invece consigliato perché presenta una scarsa attività di tampone alle basse temperature e causa lo spostamento di grandi quantità di sodio all'interno delle cellule [44].

Infine, in molti casi, si preferisce arricchire la soluzione con agenti antimicrobici a largo spettro per prevenire la proliferazione microbica. In questo modo si tenta di eliminare la flora patogena che è in grado di produrre tossine utilizzando i differenti componenti del diluente come substrato metabolico.

Una fase molto sensibile nel processo di crioconservazione è l'aggiunta, o la rimozione, del crioprotettore [45]. Molti protocolli prevedono la somministrazione di questi agenti goccia a goccia, con un continuo mescolamento per parecchi minuti così da consentire una graduale disidratazione e, quindi limitare la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno della cellula; tuttavia, alcuni crioprotettori non permeanti possono essere aggiunti in un unico stadio, riducendo l'esposizione delle cellule a queste sostanze. Anche la rimozione del crioprotettore deve avvenire lentamente e dovrebbe essere seguita da risciacquo in un terreno, ad esempio il PBS, per prevenire i danni dovuti allo stress osmotico.

## **2.6 Le tecniche di congelamento**

Gli spermatozoi, come altri tipi cellulari, possono essere congelati attraverso l'utilizzo di due tecniche distinte basate principalmente sulla velocità alla quale avviene il congelamento e sulla concentrazione di crioprotettore all'interno del medium ma

caratterizzate da fasi di scongelamento e di rimozione del crioprotettore (reidratazione) che differiscono solo leggermente.

Il processo di congelamento lento fu il primo meccanismo di crioconservazione ad essere proposto [46] e si basa sull'utilizzo di crioprotettori permeanti a lenta diffusione contenenti glicerolo al 15%. Per prima cosa il campione viene raffreddato dalla temperatura ambiente a +4°C in circa 20-30 minuti, successivamente la sua temperatura viene abbassata ancora fino a -40°C o -80°C con un velocità di circa 10-15°C/min e infine avviene il tuffo in azoto liquido a -196°C.

Quindi, in questa tecnica, il raffreddamento è lento e controllato ma lo scongelamento è caratterizzato da elevate velocità di riscaldamento. La bassa velocità a cui le cellule vengono congelate assicura che gli scambi tra il comparto intracellulare e quello extracellulare si realizzi senza provocare una deformazione della cellula o uno shock osmotico e proprio questa caratteristica conferisce la denominazione di congelamento in presenza di equilibrio al processo. Il crioprotettore è utilizzato a basse concentrazioni e ciò, se da un lato causa la comparsa di danni dovuti alla tossicità e alla variazione dell'osmolarità del medium, dall'altro, invece, consente la presenza di alte concentrazioni di ioni, macromolecole ed altri soluti che mantiene a bassi livelli la formazione di cristalli di ghiaccio.

Il congelamento lento può essere anche automatizzato mediante l'impiego di congelatori programmabili che riescono a raffreddare gradualmente il liquido seminale ad un cooling rate compreso tra 1°C/min e 10°C/min fino a raggiungere una temperatura vicina ai -196°C prima di depositare il campione direttamente in azoto liquido. Questa procedura consente un controllo maggiore della fase di congelamento, perciò riduce ulteriormente le lesioni cellulari dovute a velocità di raffreddamento inadeguate, ma comporta tempi e costi più alti [42].

La procedura di congelamento rapido, proposta da Sherman nel 1990 [41], è caratterizzata da un cooling rate molto elevato, intorno ai 20°C/min, ma consente di portare dapprima le cellule lentamente fino a -25°C o -30°C per poi raffreddarle rapidissimamente prima sui vapori d'azoto per 8-10 minuti e poi direttamente in azoto liquido. È la metodica più utilizzata e presuppone concentrazioni di CP, permeanti e non permeanti, molto alte che, favorendo una rapida disidratazione, permettono un congelamento anticipato; pertanto le cellule e i tessuti congelati non potranno



raggiungere l'equilibrio osmotico con le concentrazioni extracellulari prima del congelamento.

Il congelamento rapido è perciò definito, insieme alla vitrificazione, come tecnica di congelamento in assenza di equilibrio.

La vitrificazione è intesa come il passaggio fisico di una soluzione dallo stato liquido allo stato vetroso mediante una procedura di congelamento rapido che non causa la formazione di ghiaccio. Tale fenomeno si verifica quando il volume nel quale le cellule sono sospese è molto basso (soltanto pochi  $\mu\text{l}$ ) e quindi la viscosità dell'intera soluzione subisce un forte aumento; in questo piccolo volume, inoltre, la concentrazione di crioprotettore è elevata (circa tre o quattro volte maggiore a quella utilizzata nei protocolli di congelamento lento), questo favorisce una intensa disidratazione che limita fortemente la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari [33]. Il processo prevede l'iniziale esposizione del campione al crioprotettore e, in tempi molto ristretti, l'immersione dello stesso in azoto liquido, tale processo permette un cooling rate, fino a circa  $15.000\text{-}20.000^\circ\text{C}/\text{min}$  [47].

La vitrificazione fornisce un grande vantaggio rispetto ad altre procedure di congelamento perché evita la formazione di ghiaccio all'interno delle cellule e quindi, ne favorisce la sopravvivenza. Tuttavia presenta anche degli svantaggi, ad esempio l'alta concentrazione di crioprotettori nel medium può risultare tossica e causare danni osmotici e ciò indirizza la ricerca verso la scoperta di CP meno tossici e maggiormente permeabili; inoltre sospendere le cellule in un volume estremamente basso limita enormemente il numero di spermatozoi che possono essere vitrificati e rende questa tecnica non adatta agli spermatozoi ma piuttosto ad ovociti ed embrioni derivanti da tecniche di PMA.

## **2.7 Successo della crioconservazione**

Dopo lo scongelamento si può constatare se il processo di crioconservazione è avvenuto correttamente grazie a dei meccanismi di controllo:

1. Fattore di sopravvivenza al congelamento (CSF), che viene così calcolato

$$\text{CSF} = \frac{\% \text{ spermatozoi mobili post - scongelamento}}{\% \text{ spermatozoi mobili pre - congelamento}} \times 100 \quad [48]$$

Il processo viene considerato adeguato se il valore di CSF risulta maggiore o uguale al 50%.

2. Calcolo della concentrazione e del numero di spermatozoi mobili progressivamente post-scongelamento. In questo caso la crioconservazione ha avuto successo se la percentuale di spermatozoi mobili progressivi è maggiore o uguale al 30% [49].

### **3 SCOPO DEL LAVORO**

Esistono numerosi protocolli di crioconservazione la cui efficienza dipende dai parametri seminali pre-congelamento, strettamente dipendenti dallo stato di salute del paziente, dall'eventuale assunzione di agenti chemioterapici o antibiotici e dall'esposizione a radioterapie.

La normativa vigente che regola l'attività dei centri di Procreazione Medicalmente Assistita, Decreto Legislativo n°16 del 25 gennaio 2010, prevede che ogni protocollo in uso presso i centri, venga validato sulla base di studi effettuati in loco e/o di dati tratti dalla bibliografia esistente.

Un protocollo validato è comunque sottoposto a periodica revisione mediante nuovi studi di confronto con eventuali nuovi protocolli.

Durante il periodo di stage, svolto nel laboratorio di Seminologia del Centro di Diagnosi e Cura della Sterilità della Clinica del Mediterraneo di Ragusa, nel periodo compreso tra settembre e dicembre 2011, abbiamo posto la nostra attenzione alla validazione di due protocolli di crioconservazione del liquido seminale. Tra le varie procedure di congelamento esistenti la nostra scelta ha riguardato il protocollo proposto dal Manuale di laboratorio WHO per l'analisi del liquido seminale - Quinta Edizione e il protocollo indicato della Irvine Scientific, una società fondata nel 1970 produttrice dei soluzioni di crioconservazione.

## 4 MATERIALI E METODI

Il campione è stato ottenuto per masturbazione e raccolto in un contenitore sterile con tappo a vite mostrante il nome del paziente e l'ora di raccolta, è stato poi mantenuto a 37°C per circa 20 minuti così da permettere la liquefazione. Infatti immediatamente dopo l'eiaculazione gli spermatozoi vengono intrappolati in un coagulo semisolido formato dalle proteine secrete dalle vescicole seminali, questo fluidifica, solitamente, entro 15 minuti grazie all'azione di proteasi prostatiche che ne aumentano l'osmolarità, anche se in alcuni casi può impiegare fino a 60 minuti (Björndahl, Kvist, 2003; Cooper et al., 2005).

Completata la liquefazione, abbiamo effettuato la valutazione dei parametri chimico-fisici. La viscosità e il volume sono stati valutati mediante una pipetta monouso in plastica che consente di prelevare per intero il campione dal contenitore e di lasciarlo gocciolare per gravità in modo da verificare la lunghezza del filamento ottenuto: un liquido seminale normale fluisce goccia a goccia dalla pipetta ed ha un volume pari o maggiore a 1,5 ml mentre un seme anomalo forma un filamento lungo più di 2 cm.

Il liquido seminale è di colore avorio ma può apparire diversamente se alterato, ad esempio è rossastro se è presente emospermia, cioè se contiene emazie e giallastro in pazienti affetti da ittero o che assumono alcuni tipi di vitamine e farmaci.

Il pH è stato valutato tramite un indicatore con range da 7 a 8,4 tenendo presente che un pH pari a 7,2 è considerato come valore minimo soglia.

Sempre nel contesto degli studi iniziali abbiamo poi effettuato una prima valutazione microscopica a fresco, su un microscopio invertito ad ingrandimento 10x, per testare la presenza di spermioagglutinazione e di aggregazione nemaspermica, vale a dire la presenza di adesione degli spermatozoi mobili o immobili tra di loro ma anche ai filamenti di muco, alle altre cellule o ai detriti; questa prima osservazione consente di stimare il numero di altre cellule presenti nel liquido seminale, cellule epiteliali del tratto genitourinario e cellule rotonde (leucociti e cellule germinali).

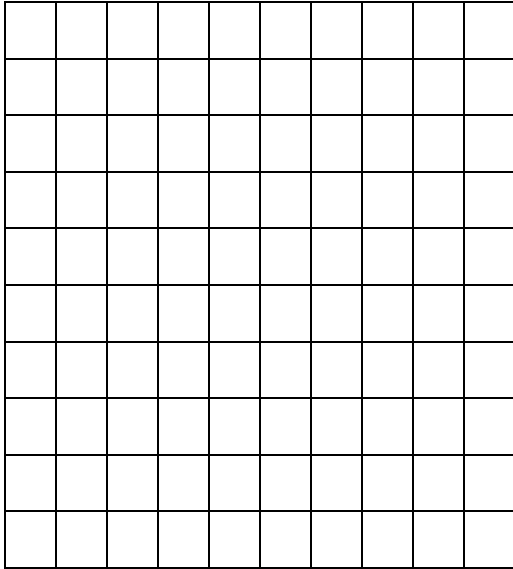
La motilità spermatica è stata valutata con un'osservazione microscopica a fresco entro la prima ora dall'eiaculazione per limitare le alterazioni dovute alla disidratazione, al pH, ai cambiamenti di temperatura; in questo caso abbiamo posto su un vetrino porta-

oggetto 10  $\mu\text{l}$  di campione, abbiamo coperto con vetrino copri-oggetto 22x22 mm e abbiamo effettuato l'osservazione su un microscopio invertito ad ingrandimento 40x distinguendo gli spermatozoi in quattro categorie in base al tipo di motilità [53]:

1. Spermatozoi con motilità di tipo a (progressiva veloce), quelli che si muovono attivamente in modo lineare ( $> 25 \mu\text{m/s}$  a  $37^\circ\text{C}$ );
2. Spermatozoi con motilità di tipo b (progressiva lenta o irregolare);
3. Spermatozoi con motilità di tipo c (non progressiva);
4. Spermatozoi con motilità di tipo d (immobili);

Gli spermatozoi con motilità di tipo a e quelli di tipo b, nel complesso, costituiscono la popolazione di spermatozoi progressivi (PR) [54].

Per determinare la conta spermatica, cioè il calcolo della concentrazione nemaspermica nel liquido seminale abbiamo diluito un'aliquota del campione in acqua con rapporto 1:1 e ci siamo serviti della camera di conta di Makler, costituita da due parti: una base metallica porta-oggetto su cui vengono posti 10  $\mu\text{l}$  di campione e una parte superiore copri-oggetto su cui è disegnata al laser una griglia quadrettata (100 quadretti di 0,1 x 0,1 mm ciascuno). Osservando la camera di conta al microscopio invertito ad ingrandimento 10x risulta che il numero di spermatozoi contati su ogni riga della griglia equivale alla concentrazione in milioni/ml.



**Figura 4. Griglia di conta.**



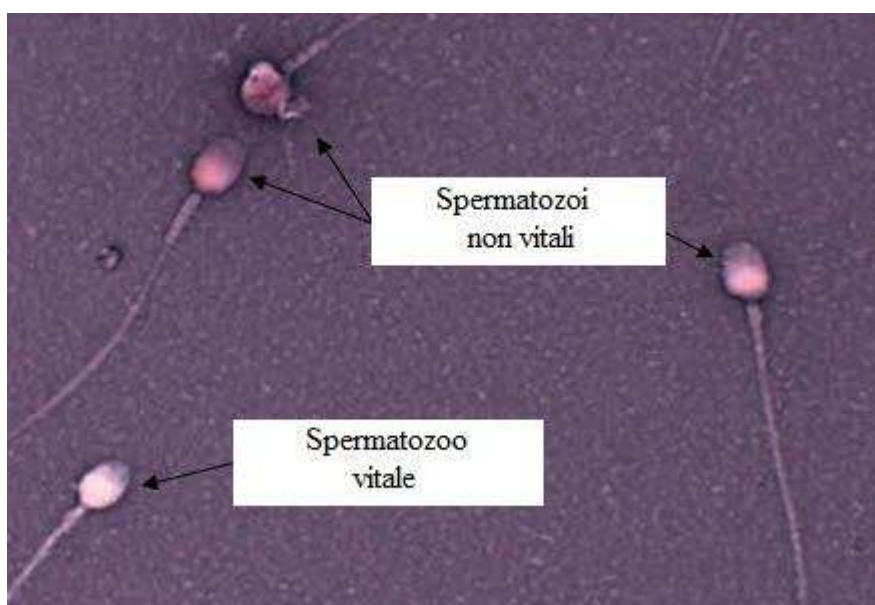
**Camera di Makler.**

Un ulteriore parametro valutato è stata la vitalità nemaspermica mediante test Eosina/Nigrosina. Grazie a questa procedura la vitalità degli spermatozoi viene determinata tenendo conto che le membrane plasmatiche delle cellule morte permettono la penetrazione di coloranti i quali invece non permeano le membrane delle cellule vitali. Per evitare effetti negativi dovuti alla disidratazione o al cambiamento di temperatura il test Eosina/Nigrosina deve essere effettuato entro la prima ora dalla fluidificazione del campione.

Per eseguire il test Eosina/Nigrosina abbiamo utilizzato una soluzione contenente 0,1 g di eosina in 10 ml di soluzione allo 0,9% di NaCl e una contenente 1g di nigrosina in 10 ml di acqua distillata che, rendendo il fondo scuro, consente di distinguere più

facilmente anche gli spermatozoi scarsamente colorati. La preparazione del vetrino prevede l'aggiunta di 50  $\mu$ l di campione a 100  $\mu$ l di soluzione contenente eosina, aggiungendo infine 150  $\mu$ l di soluzione contenente nigrosina dopo aver atteso circa 30 secondi; sul vetrino porta-oggetto verranno infine collocati e strisciati con un vetrino copri-oggetto 10  $\mu$ l della sospensione ottenuta.

Abbiamo esaminato il vetrino su un microscopio ottico in campo chiaro ad ingrandimento 1000x ad immersione contando 100 spermatozoi e distinguendoli in vitali e non vitali.



**Figura 5. Eosina /Nigrosina Test**

Effettuata l'analisi dei parametri seminali abbiamo aliquotato il campione in due parti per il lavoro di ricerca. Per l'attuazione di entrambi i protocolli di crioconservazione ci siamo serviti di un unico crioprotettore, il Freezing Medium TYB con glicerolo e gentamicina, distribuito dalla Irvine Scientific, costituito da 20% di tuorlo d'uovo, 12% v/v di glicerolo e 10 $\mu$ g/ml di gentamicina solfato.

Abbiamo distinto due protocolli.

**Protocollo N°1:** Protocollo di crioconservazione proposto dal Manuale di laboratorio WHO per l'analisi del liquido seminale – Quinta Edizione. Per l'attuazione di questo protocollo abbiamo impiegato 50µl di campione e ad esso abbiamo addizionato il Freezing Medium TYB con un rapporto di 2:1; l'aggiunta di crioprotettore è una fase molto delicata nel processo di crioconservazione, infatti concentrazioni elevate di glicerolo possono risultare dannose per gli spermatozoi, pertanto è importante aggiungerlo goccia a goccia mescolando continuamente per 10 minuti. A questo punto abbiamo mantenuto il campione per 5 minuti alla temperatura di +30°C, la sospensione è stata, quindi, posta all'interno di una cryovial da 1,25 ml e collocata in un congelatore a circa -18°C per 30 minuti, in seguito posta sui vapori d'azoto (circa 10 cm dalla superficie dell'azoto) a -120°C per 10 minuti e infine trasferita in azoto liquido a -196°C.

**Protocollo N°2:** Protocollo di crioconservazione indicato dalla Irvine Scientific. Effettuato aggiungendo il crioprotettore alla frazione di campione di 25µl con rapporto 1:1, goccia a goccia, mescolando continuamente per 10 minuti.

Una volta disposta la sospensione in una cryovial da 1,25 ml, abbiamo sistemato questa in un refrigeratore a +4°C per 90 minuti prima di esporla ai vapori d'azoto a -120°C per 10 minuti e di collocarla in azoto liquido a -196°C.

Per valutare la sopravvivenza e la motilità nemaspermica ai processi di congelamento lento appena descritti abbiamo adottato una procedura di scongelamento rapido che prevede l'esposizione delle cryovials a temperature crescenti: inizialmente 10 minuti a temperatura ambiente (T.A.) e poi ancora 10 minuti a 37°C. A questo punto abbiamo eseguito un lavaggio in centrifuga a 1200 rpm (21,73G) per 10 minuti diluendo i campioni in abbondante volume di PBS (Phosphate Buffered Saline) a cui è stata aggiunta albumina umana (HSA) al 5%. Avendo rimosso il crioprotettore a piccoli volumi, per evitare lesioni cellulari dovuti allo stress osmotico (Gao et al., 1995), abbiamo quindi analizzato nuovamente la motilità e la vitalità spermatica riportando i risultati.



## 5 RISULTATI E DISCUSSIONE

I due protocolli di crioconservazione oggetto della validazione sono stati applicati su 47 pazienti che si sono rivolti al laboratorio nel periodo considerato per sottoporsi all'analisi del liquido seminale, o spermogramma. I parametri chimico-fisici e le percentuali di motilità e vitalità precedenti e successivi l'applicazione dei due protocolli sono stati riportati nella Tabella 1.

Per effettuare la validazione dei due protocolli di crioconservazione abbiamo preso in considerazione il fattore di sopravvivenza al congelamento (CSF), calcolato con il rapporto seguente:

$$\text{CSF} = \frac{\% \text{ spermatozoi mobili post - scongelamento}}{\% \text{ spermatozoi mobili pre - congelamento}} \times 100 \quad [48]$$

Anche la vitalità nemaspermica riferita ai processi di congelamento/scongelamento dei due protocolli è stata confrontata calcolando il CSF, secondo il rapporto seguente:

$$\text{CSF} = \frac{\% \text{ spermatozoi vitali post - scongelamento}}{\% \text{ spermatozoi vitali pre - congelamento}} \times 100$$

Nella Tabella 2 sono stati inseriti i dati relativi ai CSF applicati alle percentuali di motilità (CSFm 1 e CSFm 2) e vitalità (CSFv1 e CSFv2) dei due protocolli distinguendo i campioni in base alla loro concentrazione nemaspermica: in particolare nella parte superiore sono inseriti i campioni con concentrazione < 5 mln/ml, nella parte intermedia si trovano i campioni con concentrazione compresa tra 5 mln/ml e 15 mln/ml e infine, nella parte inferiore sono elencati i campioni con concentrazione > 15 mln/ml. Al fine di permettere l'utilizzazione della formula per la valutazione dei risultati (CSFm 1 e CSFm 2) abbiamo fissato un valore minimo di 0,5% quando il numero di spermatozoi mobili contati risultava talmente basso (rari) da non permettere un'espressione significativa della percentuale.

Esaminando i valori in Tabella 1 abbiamo osservato che tutti i campioni hanno subito una drastica diminuzione della motilità e della vitalità. Nella tabella 2 si evidenzia un CSF per la motilità in entrambi i protocolli inferiore al 50% per la maggior parte dei campioni.

Nei campioni con concentrazione  $\leq 5$  mln/ml (sono 7) abbiamo osservato una motilità post-scongelo molto scarsa e ciò ha prodotto dei CSFm vicini al 3%; i CSFv, invece risultano  $>50\%$  per quattro casi su sette per il protocollo 1 e per tre casi su sette per il protocollo 2.

I campioni con concentrazione compresa tra 5 mln/ml e 15 mln/ml (16 campioni) presentano CSFm1 e CSFm2 tutti inferiori al 50%, il loro valore rimane compreso tra 1,2 e 2,6 anche se in tre casi questo risulta essere leggermente maggiore: in particolare in S1021 CSFm1 è pari a 6,3 e CSFm2 è 3, in S906 CSFm1 e CSFm2 hanno lo stesso valore (14,3) e in S1009 CSFm1 è 36,7 e CSFm2 è pari a 23,3. CSFv è  $>50\%$  in undici casi su sedici per il protocollo 1 e in otto casi su sedici per il protocollo 2.

I pochi casi (10 campioni) in cui CSFm1 e CSFm2 risultano essere  $>50\%$  riguardano tutti campioni con concentrazione  $>15$  mln/ml (24 in totale) e in questi casi il CSFm 1 appare  $>50\%$  in sei casi su ventiquattro con valori variabili da 64,1 a 83,7 mentre il CSFm 2 raggiunge valori superiori al 50% in quattro casi su ventiquattro e presenta valori compresi tra 57,1 e 58,8. Diversamente, il CSFv è sovrapponibile per i due protocolli e supera il 50% in diciannove casi su ventiquattro.

Nella valutazione dei CSFm e CSFv per i due protocolli abbiamo osservato che in quattro casi su 47 quando CSFm 1 e CSFm 2 sono  $>50\%$ , e in venticinque casi su 47 CSFv1 e CSFv2 superano entrambi il 50%.

Tuttavia abbiamo riscontrato che ci sono alcuni casi in cui solamente CSF 1 oppure CSF 2 supera il 50%, questa differenza è stata individuata in due casi su 47 per quanto riguarda CSFm1 e in quindici campioni su 47 in CSFv (nove casi per CSFv1 e sei casi

per CSFv2). È rilevante il fatto che in tutti i casi in cui CSFv 2 è >50% il valore di CSFv 1 rimane comunque vicino al 50%.

I due protocolli esaminati risultano essere apparentemente sovrapponibili ma data la dimensione campionaria esigua, non è possibile applicare test statistici in grado di attribuire una significatività allo studio.

Parametri chimico-fisici							Motilità e vitalità pre-congelamento							Motilità e vitalità post protocollo 1 (WHO 2010)							Motilità e vitalità post protocollo 2 (kit Irvine)							
PAZ. cod	VOL (ml)	Ph	VISC. (cm)	LIQU. IN 30'	COL	CONC. (mln/ml)	A %	B %	C %	D %	A+B %	A+B+C %	VIT %	A %	B %	C %	D %	A+B %	A+B+C %	VIT %	A %	B %	C %	D %	A+B %	A+B+C %	VIT %	
S906	3	7.8	N	C	Av	8.4	/	2	5	93	2	7	84	/	0,5	0,5				83	/	0,5	0,5					72
S	3	7.4	N	C	Av	70	6	51	20	23	57	77		3	17	18	62	20	38	37	3	12	19	66	15	34	50	
S684	3		N	C	Av	5.6	0	25	14	61	25	40	44	/	0,5	0,5				30	/	0,5	/					15
S975	2.6	8	N	I (c.g.)	Av	2.5	0	32	12	56	32	44		/	0,5	0,5				40	/	0,5	0,5					45
S1005	3.2	7.4	N	C	Av	30	7	40	14	39	47	61		7	27	8	58	34	42	72	5	38	9	48	43	52	51	
S1002	3	8	N	I	Av	5.5	6	43	24	27	49	73	71	/	0,5	0,5				32	0,5	0,5	0,5					42
S1006	3.4	7.8	N	I (c.g.)	Av	74	26	25	10	39	51	61	86	9	26	22	43	35	57	47	10	29	23	38	39	62	49	
S1007	4.4	8	N	I (c.g.)	Av	19	13	25	13	49	38	50	80	/	20	20	60	20	40	66	/	0,5	0,5					45
S1009	2.8	7.6	N	C	Av	12	8	38	14	40	46	60	89	/	12	10	78	12	22	61	/	9	5	86	9	14	47	
S1012	3.7	8.5	A	C	Av	17	7	43	32	18	50	82	52	0,5	0,5	0,5				35	/	0,5	0,5					49
S943	4	8.2	N	C	Av	42	18	42	21	18	60	81	66	/	0,5	0,5				45	1	13	11	75	14	25	31	
S1013	5.3	8	N	C	Av	9	22	43	21	14	65	86	89	/	0,5	0,5				52	/	0,5	0,5					43
S1014	3.2	7.8	A	I	G	64	4	33	19	44	37	56	75	5	42	12	41	47	59	28	/	0,5	0,5					24
S1016 (elevata astinenza)	3	7.6	N	C	G	118	3	21	18	58	24	42	51	/	0,5	0,5				31	/	0,5	0,5					34
S1016 (scarsa astinenza)	3	7.8	N	C	G	50	25	34	13	28	59	72	54	/	0,5	0,5				26	/	0,5	0,5					39
S1015	2	8	N	C	Av	29	10	43	20	27	53	73	77	/	0,5	0,5				48	/	0,5	0,5					73
S990	2.6	8	N	C	Av	76	30	45	9	15	75	84	88	7	32	19	42	39	58	61	4	24	20	52	28	48	61	
S1017	3.2	7.6	N	C	Av	8	3	28	18	51	31	49	70	/	0,5	0,5				29	/	0,5	0,5					35
S561	2.8	7.8	N	C	Av	120	21	30	13	36	51	64	72	8	17	14	59	27	41	42	4	29	16	51	33	49	56	
S822	2.2	8.2	N	I (c.g.)	Av	14	6	34	21	39	40	61	67	/	0,5	0,5				41	/	0,5	0,5					58
S950	4.5	7.8	N	C	Av	1	16	25	17	41	41	57	79	/	0,5	0,5				24	/	0,5	0,5					27
S1018	4	7.8	N	C	Av	15	11	38	21	30	49	70	71	/	0,5	0,5				44	/	0,5	0,5					27
S1019	2.9	8.2	N	I	Av	165	8	24	16	52	32	48	65	3	9	8	80	12	20	36	3	7	5	85	10	15	19	
S1021	3.4	7.8	N	I	Av	8.4	1	7	8	84	8	16	28	/	0,5	0,5				15	/	/	0,5					14
S958	3	7.6	A	I	Av	27	8	21	13	58	29	42	60	/	0,5	0,5				19	/	0,5	0,5					29
S1023	2.5	8	N	C	Av	6	13	46	11	30	59	70	51	0,5	0,5	0,5				33	0,5	0,5	0,5					23
S1025	6	7.8	N	C	G	9	2	16	19	63	18	37	61	/	0,5	0,5				38	/	0,5	/					17
S1026	2.5	7.8	N	I (c.g.)	Av	18	13	28	18	41	41	59	55	/	0,5	0,5				39	/	0,5	0,5					40
S1027	1.5	7.8	N	C	Av	95	30	41	7	21	71	79	78	10	17	10	63	27	37	42	6	15	3	76	21	24	45	

S1028	2	7.8	6	C	Av	40	24	35	11	30	59	70	53	/	0,5	0,5					28	0,5	0,5	0,5					34
S1033	1.5	7.8	N	C	Av	12	12	26	22	40	38	60	62	/	0,5	0,5					30	/	0,5	0,5					27
S816	3	7.8	N	C	Av	84	11	34	26	29	45	71	67	/	0,5	0,5					43	/	0,5	0,5					43
S	3.8	7.8	N	C	Av	90	16	33	21	30	49	70	83	0,5	0,5	0,5					43	0,5	0,5	0,5					44
S1037	5.8	8	N	I (c.g.)	Av	10	11	22	17	50	33	50	51	/	0,5	0,5					23	/	0,5	0,5					39
S713	1.8	7.8	N	C	Av	30	45	28	10	17	73	83	82	0,5	0,5	0,5					42	0,5	0,5	0,5					61
S1041	4.2	8	N	C	Av	9	9	26	10	55	35	45	44	/	0,5	0,5					28	/	0,5	0,5					32
S1039	2.9	7.8	N	I (c.g.)	Av	145	30	26	18	26	56	74	85	0,5	0,5	0,5					61	0,5	0,5	0,5					54
S1038	4.4	7.8	N	C	Av	141	34	38	15	14	72	86	88	0,5	0,5	0,5					49	0,5	0,5	0,5					54
S983	4.4	7.6	N	C	Av	3.5	0	17	16	67	17	34	56	/	0,5	0,5					14	/	0,5	0,5					20
S1043	2.2	8.4	N	C	R	26	15	40	13	32	55	68	61	/	0,5	0,5					33	/	0,5	0,5					44
S1042	1.4	8.2	N	C	Av	50	12	25	14	49	35	51	67	/	0,5	0,5					23	/	0,5	0,5					30
S1044	4	7.6	N	C	G	1	0	9	9	82	9	18	31	/	/	/	100				18	/	/	0,5					20
S1045	3.2	7.8	A	C	Av	2	30	35	8	27	65	73	75	/	/	0,5					30	/	/	0,5					46
S1023	2.8	7.8	N	C	Av	15	17	31	10	42	48	58	60	0,5	0,5	0,5					22	0,5	0,5	0,5					27
S1046	3.8	7.6	N	I (c.g.)	Av	6	5	17	13	65	22	35	40	/	0,5	0,5					26	/	/	0,5					28
S	5	7.8	N	C	G	3	7	16	19	58	23	42	65	/	/	0,5					40	/	/	0,5					28
S1056	5.5	7.4	N	C	G	3.5	9	11	17	63	20	37	53	/	0,5	0,5					30	/	/	0,5					23

**Tabella 1. Parametri chimico-fisici (volume, pH, viscosità, liquefazione in 30', colore, concentrazione) e valori di motilità e vitalità pre-congelamento e post-scongelo dopo l'applicazione dei due protocolli.**

**LEGENDA: N Normale; A Aumentata; C Completa; I incompleta; c.g. corpi gelatinosi; Av Avorio; G Giallastro; R Rossastro.**

PAZIENTE (cod.)	CONC. (mln/ml)	pH	VOL. (ml)	VISCOS. (cm)	COLORE	LIQUEFZ. IN 30'	CSFm 1	CSFm 2	CSFv 1	CSFv 2
S950	1	7,8	4,5	N	Av	C	1,8	1,8	30,4	34,2
S1044	1	7,6	4	N	G	C	0,0	2,8	58,1	64,5
S1045	2	7,8	3,2	A	Av	C	0,7	0,7	40,0	61,3
S975	2,5	8	2,6	N	Av	I (c.g.)	2,3	2,3	90,9	102,3
S(minardo )	3	7,8	5	N	G	C	1,2	1,2	61,5	43,1
S983	3,5	7,6	4,4	N	Av	C	2,9	2,9	25,0	35,7
S1056	3,5	7,4	5,5	N	G	C	2,7	1,4	56,6	43,4
S1002	5,5	8	3	N	Av	I	1,4	2,1	45,1	59,2
S684	5,6		3	N	Av	C	2,5	1,3	68,2	34,1
S1023	6	8	2,5	N	Av	C	2,1	2,1	64,7	45,1
S1046	6	7,6	3,8	N	Av	I (c.g.)	2,9	1,4	65,0	70,0
S1017	8	7,6	3,2	N	Av	C	2,0	2,0	41,4	50,0
S906	8,4	7,8	3	N	Av	C	14,3	14,3	98,8	85,7
S1021	8,4	7,8	3,4	N	Av	I	6,3	3,1	53,6	50,0
S1013	9	8	5,3	N	Av	C	1,2	1,2	58,4	48,3
S1025	9	7,8	6	N	G	C	2,7	1,4	62,3	27,9
S1041	9	8	4,2	N	Av	C	2,2	2,2	63,6	72,7
S1037	10	8	5,8	N	Av	I (c.g.)	2,0	2,0	45,1	76,5
S1009	12	7,6	2,8	N	Av	C	36,7	23,3	68,5	52,8
S1033	12	7,8	1,5	N	Av	C	1,7	1,7	48,4	43,5
S822	14	8,2	2,2	N	Av	I (c.g.)	1,6	1,6	61,2	86,6
S1018	15	7,8	4	N	Av	C	1,4	1,4	62,0	38,0
S1023	15	7,8	2,8	N	Av	C	2,6	2,6	36,7	45,0
S1012	17	8,5	3,7	A	Av	C	1,8	1,2	67,3	94,2
S1026	18	7,8	2,5	N	Av	I (c.g.)	1,7	1,7	70,9	72,7
S1007	19	8	4,4	N	Av	I (c.g.)	80,0	2,0	82,5	56,3
S1043	26	8,4	2,2	N	R	C	1,5	1,5	54,1	72,1
S958	27	7,6	3	A	Av	I	2,4	2,4	31,7	48,3
S1015	29	8	2	N	Av	C	1,4	1,4	62,3	94,8
S1005	30	7,4	3,2	N	Av	C	68,9	85,2	118,0	83,6
S713	30	7,8	1,8	N	46 Av	C	1,8	1,8	50,0	74,4

S1028	40	7,8	2	6	Av	C	1,4	2,1	52,8	64,2
S943	42	8,2	4	N	Av	C	1,2	30,9	68,2	47,0
S1016 (scarsa astinenza)	50	7,8	3	N	G	C	1,4	1,4	48,1	72,2
S1042	50	8,2	1,4	N	Av	C	2,0	2,0	34,3	44,8
S1014	64	7,8	3,2	A	G	I	105,4	1,8	37,3	32,0
S(bisi)	70	7,4	3	N	Av	C	49,4	44,2	48,1	64,9
S1006	74	7,8	3,4	N	Av	I (c.g.)	93,4	101,6	54,7	57,0
S990	76	8	2,6	N	Av	C	69,0	57,1	69,3	69,3
S816	84	7,8	3	N	Av	C	1,4	1,4	64,2	64,2
S(fracapane)	90	7,8	3,8	N	Av	C	2,1	2,1	51,8	53,0
S1027	95	7,8	1,5	N	Av	C	46,8	30,4	53,8	57,7
S1016 (elevata astinenza)	118	7,8	3	N	G	C	2,4	2,4	60,8	66,7
S561	120	7,8	2,8	N	Av	C	64,1	76,6	58,3	77,8
S1038	141	7,8	4,4	N	Av	C	1,7	1,7	55,7	61,4
S1039	145	7,8	2,9	N	Av	I (c.g.)	2,0	2,0	71,8	63,5
S1019	165	8,2	2,9	N	Av	I	41,7	31,3	55,0	29,0

**Tabella 2. LEGENDA: N Normale; A Aumentata; C Completa; I incompleta; c.g. corpi gelatinosi; Av Avorio; G Giallastro; R Rossastro.**

## 6 CONCLUSIONI

La motilità post-scongelo risulta notevolmente peggiorata in tutti i casi esaminati, ciò potrebbe essere dovuto alla condizione iniziale del campione, infatti analizzando i dati anamnestici abbiamo riscontrato, tra i pazienti inseriti nello studio, la presenza di fattori perturbanti la qualità del liquido seminale (fumo, varicocele, un caso di torsione testicolare, infezioni delle vie genitali e ghiandole accessorie) e di problemi di infertilità.

Entrambi i protocolli sono stati validati per l'applicazione in tecniche di PMA di II e III livello, in quanto per tali tecniche è sufficiente una bassa concentrazione di spermatozoi vitali e non necessariamente mobili.

Per saggiare l'efficienza della tecnica di congelamento in entrambi i protocolli, sarebbe stato necessario il confronto con un gruppo di controllo costituito da campioni normozoospermici. Tale gruppo non è stato formato in quanto i pazienti afferenti al centro sono in maggior parte infertili.





## BIBLIOGRAFIA

- [1] Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA. (2000) *WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male*. Cambridge University Press, Cambridge Silber SJ (1989) *The relationship of abnormal semen parameters to male fertility*. *Hum Reprod*. 4: 947-953.
- [2] [www.who.int/research/en/](http://www.who.int/research/en/)
- [3] Wolf-Bernhard Schill, Frank H. Comhaire, Timothy B. Hargreave. *Andrologia Clinica*. Springer 2009; 13: 33; 35-39; 16: 125-132.
- [4] Sebrazes J. *L'orchite de la varicelle*. *Bull Acad Natl Med (Paris)* 1927; 98: 122-127.  
Wesselhoeft C, Pearson CM. *Orchitis in the course of severe chicken pox with pneumonitis, followed by testicular atrophy*. *N Engl J Med*. 1950; 242: 651-652.  
Ormiston G. *Orchitis as a complication of a chicken-pox*. *Br Med J*. 1953; 1: 1203-1204.  
Turner RB. *Orchitis as a complication of chicken-pox*. *Pediatric Infect Dis*. 1987; 6: 489.  
Riggs S, Samford JP. *Viral orchitis*. *N Engl J Med*. 1962; 266: 990-993.
- [5] Michael L, Eisemberg and Larry I, Lipshultz. *Varicocele-induced infertility: newer insights into its pathophysiology*. *Indian J Urol*. 2011; 27(1): 58-64.
- [6] Schoor RA, Elhanbly SM, Niederberger C. *The pathophysiology of varicocele-associated male infertility*. *Curr Urol Rep*. 2001; 2: 432-436.  
Turner TT, Caplis LA, Brown KJ. *Vascular anatomy of experimentally induced left varicocele in the rat*. *Lab Anim Sci*. 1996; 46: 206-210.
- [7] Sweeney TE, Rozum JS, Gore RW. *Alteration of testicular microvascular pressures during venous pressure elevation*. *Am J Physiol*. 1995; 269: 37-45.  
Sweeney TE, Rozum JS, Desjardins C, Gore RW. *Microvascular pressure distribution in the hamster testis*. *Am J Physiol*. 1991; 260: 1581-1589.
- [8] *The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics*. World Health Organization. *Fertil Steril*. 1992; 57: 1289-1293.
- [9] Pierik FH, Abdesselam SA, Vreeburg JT, Dohle GR, De Jong FH, Weber RF. *Increased serum inhibin B levels after varicocele treatment*. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001; 54: 775-780.

Mormandi E, Levalle O, Ballerini MG, Hermes R, Calandra RS, Campo S. Serum levels of dimeric and monomeric inhibins and the degree of seminal alteration in infertile men with varicocele. *Andrologia*. 2003; 35: 106-111.

- [10] Comhaire F, Kunnen M. Selective retrograde venography of the internal spermatic vein: a conclusive approach to the diagnosis of varicocele. *Andrologia*. 1976; 8: 11-14.

Comhaire F, Kunnen M, Nahoum C. Radiological anatomy of the internal spermatic vein(s) in 200 retrograde venograms. *Int J Androl*. 1981; 4: 379-387.

- [11] Comhaire F, Vrmeulen A. Varicocele sterility: cortisol and catecholamines. *Fertil Steril*. 1977; 25: 88-95.

Steeno O, Koumans J, De Moor P. Adrenal cortical hormones in the spermatic vein of 95 patients with left varicocele. *Andrologia*. 1976; 8: 101-104.

- [12] Marmar JL. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum Reprod Update*. 2001; 7: 461-472.

- [13] Dalton TP, He L, Wang B, Miller ML, Jin L, Stringer KF, et al. Identification of mouse *SLC39A8* as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 3401-3406.

- [14] De Lamirande E, Lamothe G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46: 502-510.

De Lamirande Em Cagnon C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med*. 1995; 18: 487-495.

- [15] Lenzi A, Culasso F, Gandini L, Lombardo F, Dondero F. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum Reprod*. 1993; 8: 1657-1662.

Cavallini G, Ferraretti AP, Giomaroli L, Biagiotti G, Vitali G. Cinnoxiam and L-carnitine/acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. *J Androl*. 2004; 25: 761-770.

- [16] [www.epicentro.iss.it](http://www.epicentro.iss.it)  
[www.societaitalianaendocrinologia.it](http://www.societaitalianaendocrinologia.it)

- [17] Sokol RZ. Endocrinology of male infertility: evaluation and treatment. *Semin Reprod Med*. 2009; 27(2): 149-158.

- [18] Coppola A. *Endocrine diseases and male infertility. Minerva Med.* 1997; 88(9): 355-363.
- [19] Swerdan AJ, Higgins CD, Pike MC. *Risk of testicular cancer in a cohort of boys with cryptorchidism. BMJ.* 1997; 314: 1507-1511.  
Paulksen DF, Einhorn LH, Prickham HJ, Williams SD. *Cancer of the testis. In Cancer, De Vita eds, pp 786-882, Lippincott Co, 1982.*  
Miyamoto H, Miura T, Noguchi S, Shuin T, Kubota Y, Hosaka A. *A clinical study of 115 patients with testicular tumors. Hnyokika kiyo.* 1992; 38(7): 797-802.
- [20] Spinelli C, Migliore E, Miccoli P. *Ritenzione testicolare ed anomalie urogenitali associate. Rass It Chir Ped.* 1989; 31: 148.  
Noble M, Wackson J. *Screening excretory urography in patients with cryptorchidism or hypospadias: a survey and review of the literature. J Urol.* 1980; 124: 98.
- [21] Opitz JM, Simpson JL. *Pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. Clin Genet.* 1972; 3: 1026.  
McPhaul MJ, Marcelli M. *Genetic basis of endocrine disease. J Clin Endocrin Metab.* 1993; 76: 17.
- [22] [www.airc.it/tumori/tumore-ai-testicoli.asp](http://www.airc.it/tumori/tumore-ai-testicoli.asp)
- [23] Sklar C. *Reproductive physiology and treatment-related loss of sex hormone production. Med Pediatric Oncol.* 1999; 33: 2-8.  
Sklar CA, Constine LS. *Chronic neuroendocrinological sequelae of radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995; 31: 1113-1121.
- [24] Byrne J, Mulvihill JJ, Myers MH, et al. *Effects of treatment on fertility in long-term survivors of childhood or adolescent cancer. N Engl J Med.* 1987; 317: 1315-1321.  
Chapman RM, Sutcliffe SB, Rees LH, et al. *Cyclical combination chemotherapy and gonadal function: Retrospective study in males. Lancet.* 1979; 1: 285-289.
- [25] Clark ST, Radford JA, Crowter D, et al. *Gonadal function following chemotherapy for Hodgkin's disease: A comparative study of MVPP and a seven-drug hybrid regimen. J Clin Oncol.* 1995; 13: 134-139.  
Shaffold EA, Kingston JE, Malpas JS, et al. *Testicular function following the treatment of Hodgkin's disease in childhood. Br J Cancer.* 1993; 68: 1199-1204.  
Mackie EJ, Radford M, Shalet SM. *Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's disease. Med Pediatr Oncol.* 1996; 27: 74-78.

- Cunha MF, Meistrich ML, Fuller LM, et al. Recovery of spermatogenesis after treatment for Hodgkin's disease: Limiting dose of MOPP chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1984; 2: 571-577.
- [26] Hsiao W, Stahl PJ, Osterberg EC, Nejat E, Palermo GD, Rosenwaks Z, et al. Successful treatment of postchemotherapy azoospermia with microsurgical testicular sperm extraction: the Weill Cornell experience. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 1607-1611.
- Jahnukainen K, Ehmcke J, Hou M, Schlatt S. Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011; 25: 287-302.
- [27] McMurray e Kortun 2003; Karagiannis et El Osta 2004; Rockett et al. 2004.
- [28] Carolyn M, Fronczak MD, MSPH, Edward D, Kim MD, Al B, Barqami MD. The insults of illicit drug use of male fertility. 2001 *Journal of Andrology.*
- [29] [www.iss.it/rpma/glos/cont.php?id=108&lang=1&tipo=17](http://www.iss.it/rpma/glos/cont.php?id=108&lang=1&tipo=17).
- [30] SP Leibo, Ph D, Thomas B, Pool, Ph D. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures and rate changes. 2011; 96(2): 269-271.
- [31] Cryo Bio System. *Fundamentals of Cryobiology.* Paris: CryoBioSystem 2006. [www.cryobiosystem-inv.com/Cryobiology/Basesfondamentalesdelacryobiologie/tabid/251/Default.aspx](http://www.cryobiosystem-inv.com/Cryobiology/Basesfondamentalesdelacryobiologie/tabid/251/Default.aspx).
- Fuller B, Paynter S. *Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine.* *Reprod Biomed Online.* 2004; 9: 680-691.
- Mazur P, Leibo SP, Farrant J, et al. Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells. In: Wolstenholme GE, O' Connor M, eds. *The Frozen Cell.* London: Churchill Press. 1970: 69-88.
- [32] Cassou R. La méthode des paillettes en plastique adaptée a la generalization de la congélation. *5th Int Cong Anim Reprod Artif Insem, Trento.* 1964; 4: 540-546.
- [33] Bjorndahl L, Mortimer D, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U, Alvarez JG, Haugen TB. *A practical guide to basic laboratory andrology.* Cambridge University Press. 2010; 8: 199.
- [34] Lass A, Akagbosu F, Abusheikha N, Hassouneh M, Blayney M, Avery S, et al. A programme of semen cryopreservation for patients with malignant disease in a tertiary infertility centre: lessons from 8 years' experience. *Hum Reprod.* 1998; 13: 3256-3261.

- [35] *Linee guida per la corretta gestione della banca del seme dedicata alla crioconservazione omologa. Banca del seme. Dipartimento di Fisiopatologia Medica. Università di Roma "La Sapienza".*
- [36] *Nei T. Mechanism of haemolysis of erythrocytes by freezing, with special reference to freezing at near-zero temperatures. In: Wolstenholme GE, O'Connor M, eds. The Frozen Cell. London: Churchill Press. 1970: 131-147.*  
*Merryman HT. The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. In: Wolstenholme GE, O'Connor M, eds. The Frozen Cell. London: Churchill Press. 1970: 565-569.*
- [37] *Gao D, Liu J, Liu C, et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. Hum Reprod. 1995; 10: 1109-1122.*  
*Gilmore JA, Liu J, Gao DY, et al. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. Hum Reprod. 1997; 12: 112-118.*  
*Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature. 1949; 167: 666.*
- [38] *Kleinhans FW, Mazur P. Comparison of actual vs synthesized ternary phase diagrams for solutes of cryobiological interest. Cryobiology. 2007; 54: 212-222.*
- [39] *Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. Nature. 1953; 172: 767-768.*
- [40] *Muldrew K. The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis. Cryobiology. 2008; 57: 251-256.*
- [41] *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: 229-260.*
- [42] *Fabbri R, Ciotti PM, Di Tommaso B, Magrini O, Notarangelo L, Porcu E, Contro E, Venturoli S. Tecniche di crioconservazione riproduttiva. Riv It Ost Gin vol.3. 2007: 36.*
- [43] *Holt WV. Basic aspect of frozen storage of semen. Anim Reprod Sci. 2000; 62: 3-22.*
- [44] *Keel BA, Webster BW. Semen cryopreservation methodology and results. In: Barrat CLR, Cooke ID, eds. Donor insemination. Cambridge: Cambridge University Press. 1993: 96-71.*

- [45] *Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. Reprod Biomed Online. 2004; 9: 134-151.*
- [46] *Behrman SJ, Sawada Y. Heterologous and homologous insemination with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. Fertil Steril. 1966; 17: 457-466.*
- [47] *Gosden R. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. Fertil Steril. 2011; 96(2): 266-267.*
- [48] *Mortimer D. Laboratorio pratico di Andrologia. CIC Edizioni Internazionali. 1997; 14: 287-288.*
- [49] *David G, Czyglik F, Mayaux MJ, et al. Artificial insemination with frozen sperm: protocol, method of analysis and results for 1188 women. Br J Obstet Gynaecol. 1980; 87: 1022-1028.*
- [50] *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana. Anno 151° - numero 40. Decreto legislativo 25 gennaio 2010 n° 16. Allegato VII, parte B, punti da 1 a 4.*
- [51] *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana. Anno 151° - numero 40. Decreto legislativo 25 gennaio 2010 n°16. Allegato V, parte E, punti da 1 a 8.*
- [53] *WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Fourth edition. 1999; 2: 9-10.*
- [54] *Manuale di laboratorio WHO per l' esame del liquido seminale. Quinta edizione. 2010; 2: 23.*