

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**  
facoltà' di *scienze* matematiche, fisiche e  
naturali  
**Corso di Laurea in Scienze Biologiche**  
***Dipartimento di Biologia Animale "M. La***  
***Greca"***

**Effetti della crioconservazione  
sull'organizzazione del fuso meiotico  
in ovociti da trattare con tecniche di PMA**

## INDICE

<b>1.</b>	<b>Premessa</b>	Pag. 02
<b>2.</b>	<b>Introduzione</b>	Pag. 04
2.1	Il Ciclo cellulare	Pag. 04
2.2	Riproduzione Umana	Pag. 06
2.3	Ovogenesi e follicologenesi	Pag. 09
2.4	Crioconservazione	Pag. 11
2.4.1	Indicazioni cliniche	Pag. 11
2.4.2	Potenziati danni della crioconservazione	Pag. 13
2.4.3	Meccanismo di disidratazione dell'ovocita	Pag. 14
2.5	Scongelamento	Pag. 15
2.6	Vitrificazione	Pag. 16
<b>3.</b>	<b>Materiali e metodi</b>	Pag. 18
3.1	Tecniche di PMA e di Prelievo Ovocitario	Pag. 18
3.2	Crioconservazione dei gameti femminili	Pag. 24
3.2.1	Crioprotettori	Pag. 25
3.2.2	Caratteristiche dell'ovocità umano	Pag. 28
3.3	Tecniche di congelamento	Pag. 29
3.3.1	Esperimento tempo-dipendente a basse T	Pag. 35
3.4	Tecniche di scongelamento	Pag. 36
3.5	Tecnica di colorazione	Pag. 40
3.5.1	Valutazioni microscopiche	Pag. 40
3.5.2	Fotomicroscopia	Pag. 41
<b>4.</b>	<b>Risultati e discussioni</b>	Pag. 42
<b>5.</b>	<b>Conclusioni</b>	Pag. 43
<b>6.</b>	<b>Bibliografia</b>	Pag. 44
<b>7.</b>	<b>Allegati</b>	Pag.

## 1. **PREMESSA**

Trent'anni fa l'avvento della Fertilizzazione artificiale fu una vera e propria rivoluzione: per la prima volta, la fecondazione avveniva fuori dell'organismo umano, "in provetta", modificando così completamente l'approccio medico alla sterilità. Anche se lungi di vedere questa come una "condizione" da accettare con rassegnata impotenza, può invece essere vista come una vera e propria patologia, con una cura anche se non con una guarigione (le tecniche di fecondazione assistita, permettono di superare la sterilità ma non ripristinano la fertilità).

La fecondazione in vitro (FIV) è una tecnica di procreazione medicalmente assistita (PMA) che consiste nel mettere in contatto, uno o diversi ovociti (gamete femminile) con gli spermatozoi (gamete maschile).

Il problema della fecondazione assistita tra l'altro non è da sottovalutare infatti l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima intorno al 20% le coppie con problemi di fertilità e purtroppo essa è destinata ad aumentare per varie ragioni tra cui: problema ambientale, qualità degli alimenti (mancanza di antiossidanti nella dieta), lo stile di vita e la ricerca della prima gravidanza ad età più avanzata.

Inizialmente la FIV venne usata solo su donne con le tube di Falloppio ostruite, oggi è indicata anche per i seguenti casi:

- Endometriosi
- Sterilità per fattore immunologico
- Sterilità maschile (bassa conta spermatica e/o bassa motilità)
- Sterilità idiopatica.

Naturalmente il bisogno di migliorare e di ricerca in questi campi tanto delicati presuppone la necessità di trovare dei compromessi tra la liceità della ricerca scientifica e le importanti

implicazioni di ordine etico, filosofico e religioso che vengono a porsi.

Esiste una legge sulla procreazione assistita (legge 19 febbraio 2004, n. 40) che impone delle restrizioni in questo campo quali:

- la creazione di un numero di embrioni non superiore a quello necessario ad un unico e contemporaneo impianto e comunque non superiore a tre;
- il divieto della fecondazione eterologa;
- l'impossibilità di consentire interventi sull'embrione con finalità diagnostiche e terapeutiche generali;
- l'impossibilità della crioconservazione degli embrioni.

Purtroppo questa legge limitando il n° di embrioni ottenibili in un singolo ciclo di stimolazione ovarica, costringe la donna che non ottiene una gravidanza al primo tentativo a sottoporsi a più stimolazioni per raggiungere le probabilità di gravidanza che avrebbe avuto con l'applicazione delle tecniche pre-legge.

Il lavoro descritto nella presente tesi è quello di analizzare le tecniche di congelamento degli ovociti, in sostituzione alla tecnica del congelamento embrionale ormai vietata, bypassando così le implicazioni di natura etica sollevate con la crioconservazione embrionale.

In particolare gli ovociti vengono portati mediante l'applicazione di particolari protocolli a temperature estremamente basse e successivamente conservati in azoto liquido, al momento opportuno, quando la coppia lo richiede, saranno scongelati, inseminati e gli embrioni prodotti trasferiti nella cavità uterina della paziente.

## 2. Introduzione

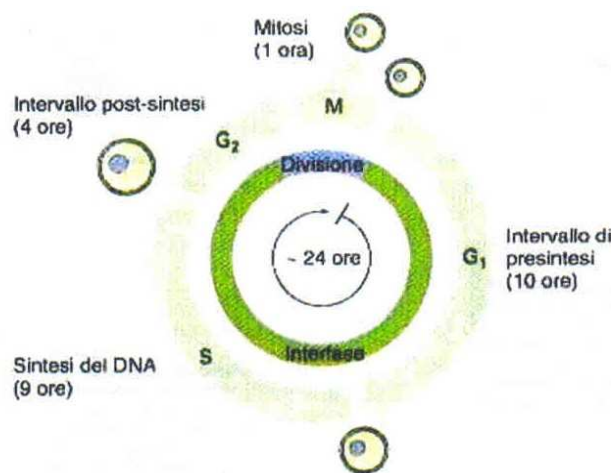
### 2.1. Il CICLO CELLULARE

Il ciclo cellulare può essere definito come quell'insieme di eventi ordinati che regolano la crescita e la divisione di una cellula in relazione a stimoli esterni.

Esistono due tipi di divisione cellulare: la mitosi e la meiosi; la prima riguarda le cellule somatiche, la seconda le cellule germinali.

Il ciclo di crescita, la mitosi e la divisione cellulare costituiscono il ciclo cellulare.

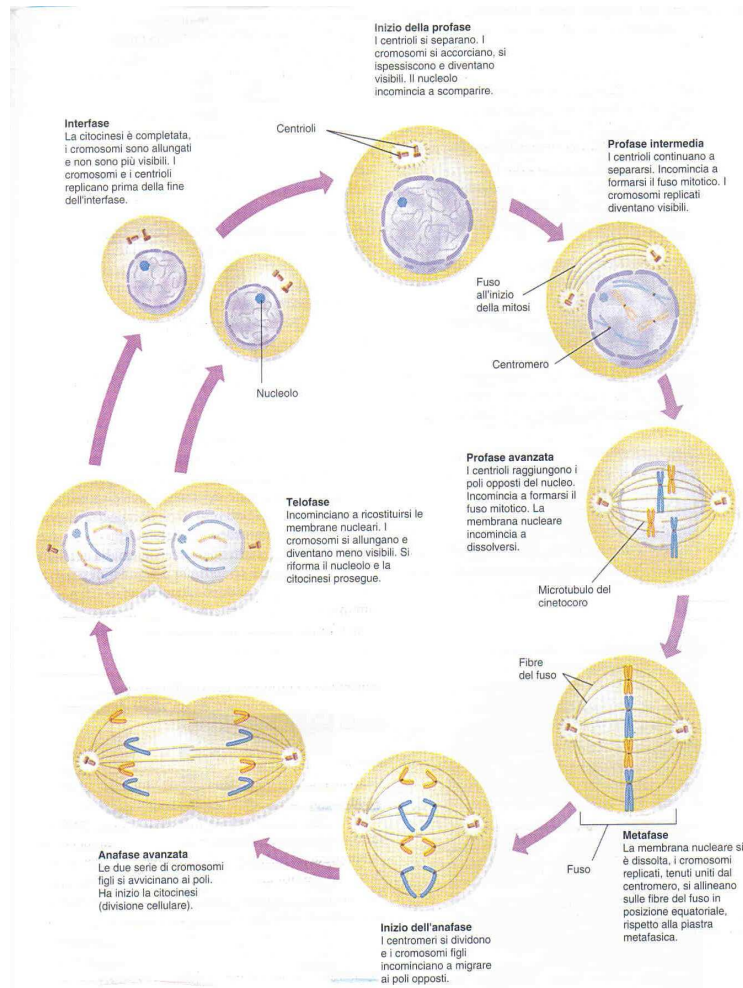
Nelle cellule somatiche in proliferazione, il ciclo cellulare consta di due fasi: la fase di mitosi (M), vale a dire di divisione, e un'interfase, tra una divisione e l'altra.



L'interfase è caratterizzata da tre tappe successive: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>.

Nella fase G<sub>1</sub> (G<sub>1</sub> sta per gap1, primo intervallo), la cellula "vive" e svolge le funzioni per le quali il processo di differenziamento l'ha preposta ed è contraddistinta da attivi fenomeni trascrizionali a livello del DNA e da sintesi proteiche nel citoplasma. La cellula ha così accresciuto il citoplasma e ha raddoppiato il proprio volume ed adesso è pronta per la fase successiva, che tra l'altro rappresenta l'evento centrale del ciclo cellulare: la fase S (sintesi). Durante la fase S si verifica la duplicazione del DNA, morfologicamente rappresentata dalla duplicazione dei cromosomi in coppie di cromatidi.

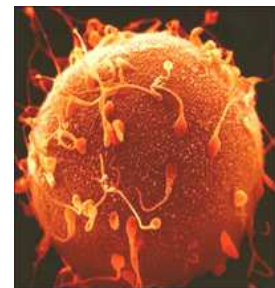
La fase successiva, G<sub>2</sub> (secondo intervallo), ha funzioni di controllo su ciò che è avvenuto prima e di preparazione alla successiva divisione. La fase mitotica M vera e propria, costituita da profase-prometafase-metafase-anafase-telofase, porta al concepimento della divisione cellulare, con la formazione di due cellule figlie identiche con un corredo cromosomico diploide (2N). Il processo è altamente conservativo.



## 2.2. RIPRODUZIONE UMANA

Nell'uomo e così come nella maggior parte degli animali la riproduzione è quell'evento che permette ad ogni individuo la possibilità di poter trasmettere parte del suo patrimonio genetico alla prole. Tutto questo è possibile grazie al differenziamento di una popolazione di cellule detta linea germinale, i cui elementi responsabili alla trasmissione dei caratteri ereditari sono i gameti.

I gameti maschili e femminili, morfologicamente e funzionalmente diversi, condividono la caratteristica fondamentale di rappresentare l'unico momento aploide del ciclo vitale, cioè quello di contenere un numero di cromosomi ridotto a metà ( $n$ ).



Nei maschi il gamete è lo spermatozoo, prodotto attraverso il processo di spermatogenesi, mentre il gamete femminile è la cellula uovo (ovocita), prodotta per oogenesi.

Il numero diploide ( $2n$ ) di cromosomi si ristabilirà proprio al momento della fecondazione, quando il gamete maschile ( $n$ ) e quello femminile ( $n$ ) si fondono formando lo zigote.

Il processo durante il quale le cellule germinali riducono a metà il loro corredo cromosomico è detto meiosi.

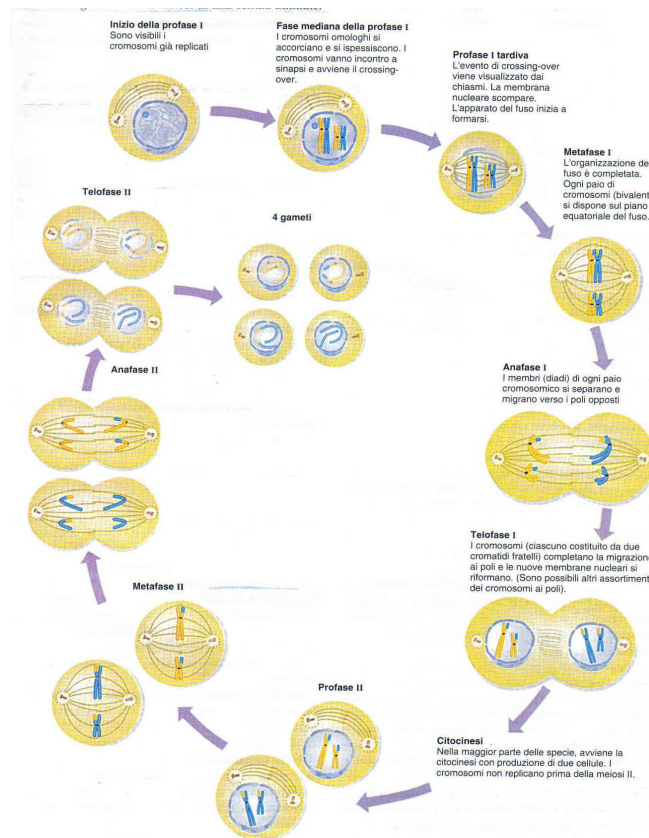
La meiosi o divisione meiotica è costituita da due successive divisioni nucleari precedute da un'unica duplicazione del materiale genetico (cioè una sola fase S) ed è per questo che la quantità di DNA risulta dimezzata nei gameti maturi.

Prima della meiosi, i cromosomi omologhi si duplicano; durante la meiosi si appaiano e subiscono due divisioni (meiosi I e meiosi II) ciascuna suddivisa in una serie di stadi corrispondenti a quelli tipici della mitosi: profase, metafase, anafase e telofase.

La meiosi I è detta divisione riduzionale in quanto porta alla riduzione del numero cromosomico da un assetto diploide ad uno aploide, mentre la meiosi II è detta divisione equazionale in quanto determina la separazione dei cromatidi fratelli. Nella maggior parte dei casi le divisioni sono accompagnate da citocinesi (divisione del citoplasma), per cui la meiosi produce da una singola cellula diploide quattro cellule aploidi, in quanto ciascuno dei quattro nuclei risultanti dalle due divisioni meiotiche riceve soltanto un cromosoma per ciascuna coppia di cromosomi omologhi.

La meiosi si verifica solo in un momento specifico del ciclo vitale dell'organismo e porta alla formazione dei gameti aploidi nella gametogenesi.





Nella *gametogenesi maschile* le due successive divisioni meiotiche portano alla formazione di quattro cellule distinte che poi si differenzieranno in spermatozoi.

Lo stesso non accade nella *gametogenesi femminile* dove la meiosi di una cellula diploide produce un unico gamete maturo (ovocita), in quanto uno solo dei nuclei diventa il nucleo dell'ovocita mentre gli altri vengono espulsi insieme con una piccola quantità di citoplasma in due o tre piccole cellule abortive dette globuli polari che non svolgono alcuna funzione e vengono perciò eliminati.

Le cellule progenitrici delle cellule germinali (linea Germinale) si distaccano molto precocemente da quelle dalle quali deriveranno le cellule somatiche (linea somatica). Una volta raggiunte nel territorio della gonade (testicoli e ovario) le cellule germinali, dopo un periodo di quiescenza più o meno

lungo, iniziano il loro differenziamento in senso maschile o femminile.

La meiosi, nonostante avvenga con le stesse modalità, differenzia nella via germinale maschile e in quella femminile.

Nella linea germinale maschile la meiosi incomincia già a partire dalla pubertà e procede rapidamente senza interruzione, invece nella linea germinale femminile gli ovogoni che iniziano subito la meiosi, entrano in profase I e restano in questo stato di quiescenza fino al raggiungimento della maturità sessuale.

La ripresa della meiosi, che prende il nome di maturazione, e il successivo completamento si hanno durante la fecondazione.

Di tutti gli ovociti che si sono formati durante la vita fetale uno solo completa la meiosi I ogni mese nella femmina adulta, ma non procede ulteriormente nella meiosi, a meno che non sia stimolato dalla fecondazione da parte di uno spermatozoo.

### 2.3. Ovogenesi

Dalla nona settimana di vita embrionale le cellule germinali primordiali (PGC) migrano dalla regione del sacco vitellino, dove si sono differenziate, e aumentando il loro numero per mitosi, si localizzano a livello delle creste genitali. Qui si differenziano in ovogoni che sono cellule ad elevato tasso di attività mitotica.

Dalla dodicesima alla tredicesima settimana gli ovogoni proliferanti si localizzano nella corticale profonda dell'ovaio e iniziano il loro differenziamento in ovociti.

Degli ovociti presenti nella zona corticale non tutti riescono a maturare; alcuni infatti si bloccano e si ha la cosiddetta *atresia del follicolo*.

Gli *ovociti primari* si accrescono, replicano il DNA ed entrano in profase della prima divisione meiotica e si arrestano in diplotene, fase nella quale possono restare anche per circa 40 anni. Gli ovogoni e gli ovociti sono circondati da uno strato di cellule somatiche del blastema ovarico che si dividono attivamente e li circondano formando la struttura prefollicolare, il follicolo primordiale. E da qui inizia tutta quella fase di eventi di maturazione del follicolo ovarico che porta alla fine all'espulsione dell'ovocita pronto per essere fecondato.

### *Follicologenesi*

Nella follicologenesi distinguiamo prevalentemente 4 tappe:

- Follicolo primordiale
- Follicolo primario
- Follicolo secondario o antrale
- Follicolo terziario

Il *follicolo primordiale* è il primo stadio di maturazione nel quale gli ovogoni si moltiplicano per mitosi e successivamente si accrescono e diventano ovociti I, le cellule follicolari si trovano disposte in un unico strato, hanno forma appiattita e delimitano all'interno l'ovocita. Sono questi follicoli primordiali che vanno incontro progressivamente a maturazione e raggiungono lo stadio di *follicolo primario* dove tra l'epitelio follicolare e l'ovocita si raccoglie il materiale della zona pellucida; la parete follicolare passa da uno strato di cellule appiattite a uno strato di cellule cubiche. All'interno di questa struttura troviamo sempre l'ovocita in via di maturazione; la zona pellucida si trova all'esterno dell'oolemma e gioca un ruolo fondamentale nell'interazione con il gamete maschile.

Dal follicolo primario si passa al *follicolo secondario* in quanto si viene a costituire la granulosa e si cominciano a

scavare delle cavità piene di liquido. Queste cavità fanno sì che attorno all'ovocita rimanga soltanto un certo numero di cellule follicolari che sono proprio adiacenti all'ovocita stesso, disposte grossomodo a corona e per questo definite cellule della corona radiata.

Successivamente queste cavità che si sono venute a scavare nello spessore della granulosa, vengono a confluire tra di loro per formare un'unica e grande cavità piena di liquido che è il liquor follicoli.

L'ultimo stadio di maturazione viene chiamato *follicolo di Graaf* o preovulatorio o maturo. E' proprio dentro al follicolo di Graaf che si realizzano la maggior parte dei processi di maturazione dell'ovocita stesso.

Quando l'ovocita è pronto il follicolo di Graaf si apre, scoppia, e l'ovocita avvolto dalle sue membrane (zona pellucida + corona radiata + cumulo ooforo) viene ad essere prelevato dalle frange dell'ovidutto avviandosi verso l'ampolla tubarica dove avverrà la fecondazione.

## 2.4. CRIOCONSERVAZIONE

### 2.4.1. INDICAZIONI CLINICHE

Il congelamento o crioconservazione degli ovociti non fertilizzati e la loro capacità di sopravvivenza allo scongelamento hanno da sempre rappresentato un "miraggio" per tutti i ricercatori che si occupano di Medicina della Riproduzione, in quanto può essere considerato come un trattamento aggiuntivo per la cura dell'infertilità. Inoltre la crioconservazione degli ovociti potrebbe essere una soluzione per alcuni problemi morali, etici e religiosi legati alla crioconservazione degli embrioni.

La crioconservazione si è rivelata di grande importanza anche per alcune patologie neoplastiche, che colpiscono giovani donne in età riproduttiva, le quali richiedono l'applicazione di trattamenti farmacologici o di interventi chirurgici di tipo demolitivi che possono causare spesso una condizione di sterilità. In questi casi la funzione riproduttiva delle pazienti potrebbe essere conservata congelando il loro tessuto ovarico/ovociti prima dell'inizio della terapia antineoplastica. Candidate potrebbero essere le giovani pazienti affette da neoplasie a carico del sistema emopoietico, carcinoma della cervice dell'utero, della mammella, del colon, della tiroide e del fegato. Ad esempio l'utilizzo di farmaci nella cura di malattie infiammatorie ad eziologia autoimmune e da malattie infiammatorie idiomatiche intestinali possono danneggiare irreversibilmente il patrimonio gonadico soprattutto se utilizzati ad alto dosaggio o per un tempo prolungato.

Anche le pazienti con disregolazioni ovariche associate ed in procinto di esaurire la propria riserva gametica potrebbero trovare nella crioconservazione del tessuto ovarico/ovociti una valida opportunità di preservare la propria funzionalità gametogenica. Il tessuto ovarico può essere prelevato mediante biopsia in qualsiasi fase del ciclo mestruale. I follicoli primordiali, presenti all'interno dello strato corticale dell'ovaio, contengono gli ovociti allo stato di profase I che presentano una migliore resistenza alle basse temperature grazie alle ridotte dimensioni, alla bassa attività metabolica, allo scarso numero di organelli citoplasmatici e all'assenza della zona pellucida la quale è maggiormente esposta ai danni provocati dal processo di congelamento. Alla completa guarigione della malattia della paziente, il tessuto ovarico potrebbe essere scongelato e trapiantato nella stessa paziente, oppure gli ovociti utilizzati per tecniche di fecondazione assistita.

#### 2.4.2. POTENZIALI DANNI DA CRIOCONSERVAZIONE

Nonostante siano stati raggiunti buoni risultati di sopravvivenza post-scongelo, i protocolli non sono ancora ben definiti per poter essere tradotti in una tecnica efficiente e di piena utilità clinica.

L'uovo è una cellula particolarmente complessa, molto sensibile a perturbazioni di carattere intrinseco ed estrinseco, dalle quali possono derivare danni letali ma anche subletali che possono avere effetti di considerevole portata nel corso dello sviluppo embrionario.

Possono essere sufficienti modeste diminuzioni della temperatura per determinare danneggiamenti a carico:

- delle membrane;
- al citoscheletro per depolarizzazione di strutture microtubulari e dei filamenti di actina, che sono collocati sotto la membrana e assolvono funzioni biologiche essenziali quali quelle richieste per la divisione cellulare;
- danni complessivi alla biologia cellulare;
- danni al meccanismo biochimico intracellulare che consente la risposta dell'ovocita al fattore attivante veicolato allo spermatozoo o della capacità di decondensare la testa degli spermatozoi.

Il principale fattore biofisico che può determinare la distruzione cellulare durante il processo di crioconservazione è la formazione di ghiaccio intracellulare che può essere evitata attraverso una adeguata disidratazione cellulare.

E' probabile che un qualche danno che causa la disorganizzazione degli elementi del citoscheletro possa portare ad anomalie cromosomiche e all'insuccesso della fertilizzazione e dello sviluppo embrionale. Infatti si è pensato che la crioconservazione degli ovociti potesse essere causa

della formazione di un grande numero di embrioni aneuploidi, a causa dei danni dell'apparato microtubulare.

Per cercare di ovviare ai danni associati al processo congelamento/scongelo si preferisce l'utilizzo di agenti crioprotettori soprattutto per evitare la formazione del ghiaccio.

Vengono utilizzati insieme crioprotettori penetranti (glicerolo, dimetilsolfossido, etilenglicole, 1,2 propandiolo) e non penetranti (saccarosio, glucosio, ficoll, amidi, proteine, lipoproteine, polivinilpirrolidone).

Gli *agenti penetranti* prevengono la formazione di ghiaccio intracellulare causando deidratazione e limitando eccessive escursioni del volume dell'ovocita (congelamento lento). Questi crioprotettori agiscono influenzando le modificazioni della membrana, che passa da uno stato relativamente fluido ad uno relativamente rigido. I *crioprotettori non penetranti* sono usati invece per aumentare la concentrazione dei soluti extracellulari, consentendo così un'ulteriore deidratazione.

Comunque bisogna considerare il fatto anche che i crioprotettori non sono sostanze inerti ma possiedono anche un certo grado di tossicità, che dipende dalla temperatura e dal tempo di esposizione, e possono indurre effetti biologici.

#### 2.4.3. MECCANISMO DI DISIDRATAZIONE DELL'OVOCITA

E' importante nella soluzione di congelamento la concentrazione del crioprotettore, infatti è quella che determina la velocità di disidratazione dell'ovocita: più alta è la concentrazione più l'ovocita si disidrata rapidamente, poiché l'acqua lascia rapidamente il citoplasma per diluire l'alta concentrazione di soluti extracellulari.

E' veramente importante stabilire quale sia il tempo ottimale di esposizione dell'ovocita alle soluzioni di congelamento. Esso infatti deve essere abbastanza lungo per

permettere una sufficiente disidratazione della cellula ma non troppo da danneggiare la cellula dal momento che si può alterare il pH intracellulare.

Un congelamento sufficientemente lento determina una progressiva disidratazione ed evita la formazione di ghiaccio intracellulare. Al contrario, se la cellula è congelata più rapidamente, ci può essere un tempo insufficiente per il trasporto dell'acqua all'esterno portando così alla formazione di ghiaccio all'interno della cellula.

## 2.5. SCONGELAMENTO

La velocità di riscaldamento è allo stesso modo critica per il successo della procedura di scongelamento.

Il problema che può insorgere durante la procedura dello scongelamento è la ricristallizzazione con formazione di ghiaccio intracellulare che può ridurre la sopravvivenza degli ovociti congelati. Se una piccola quantità di acqua intracellulare è presente quando l'ovocita è immerso nell'azoto liquido, piccoli cristalli di ghiaccio possono formarsi.

La formazione di ghiaccio intracellulare probabilmente avviene se lo scongelamento è lento, in quanto in questo modo si dà il tempo ai piccoli cristalli di ghiaccio di riunirsi in grossi cristalli di ghiaccio danneggiando l'ovocita.

Il processo di scongelamento deve essere veramente rapido (circa 275°C/min.) per permettere una dispersione rapida dei cristalli di ghiaccio intracellulari: il ghiaccio si scioglie e permea la membrana cellulare in uno stato liquido per reidratare l'ovocita.

Un altro fattore che incide sulla sopravvivenza degli ovociti dopo lo scongelamento è la rimozione del crioprotettore che avviene in una serie di tappe a concentrazioni progressivamente più basse di crioprotettore. La presenza di



un'alta concentrazione di molecole non penetranti che controbilanciano la alta concentrazione del crioprotettore nella cellula riduce lo shock osmotico e controlla l'afflusso di acqua all'interno della cellula.

La sopravvivenza ovocitaria rappresenta quindi l'unico vero fattore limitante per l'ottimizzazione del protocollo di crioconservazione.

## 2.6. VITRIFICAZIONE

La vitrificazione è una delle tecniche di crioconservazione meno sperimentata. Opera determinando elevati incrementi della viscosità della soluzione di congelamento e può essere definita come una transizione di stato, in cui soluzioni caratterizzate da concentrazioni molto elevate di crioprotettori in seguito a un abbassamento rapidissimo della temperatura (immersione in azoto liquido a pressione negativa) passano ad uno stato solido in assenza di una organizzazione cristallina.

In questo modo viene così mantenuta la distribuzione ionica e molecolare dello stato liquido normale che può essere paragonato a quello liquido molto viscoso.

La vitrificazione consente alcuni vantaggi:

- non si forma ghiaccio nella cellula;
- non ci sono gli squilibri osmotici e ionici determinati dalla formazione di ghiaccio extracellulare.

Ma presenta purtroppo lo svantaggio di esercitare effetti di tossicità acuta, a causa delle elevate concentrazioni di crioprotettori.

Attualmente si stanno facendo molti tentativi per migliorare questa tecnica, uno di questi potrebbe essere quello di sostituire i crioprotettori permanenti con altri non permanenti.

VANTAGGI DI UN PROGRAMMA DI CONGELAMENTO  
OVOCITARIO

1. Utilizzo di Ovociti sovranumerari
2. Alternativa al congelamento di embrioni
3. Si crea una possibilità di gravidanza in pazienti con neoplasie che diventerebbero sterili in seguito a chemioterapia.
4. Creazione di banche degli ovociti per pazienti che soffrono di patologie a carico del sistema riproduttivo.

Programmi di ovo-donazione (dove i sensi della legge non lo vietano).

### **3. MATERIALI E METODI**

#### *3.1. TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA (PMA)*

Secondo l'articolo 4, Legge 40/2004 il ricorso alla PMA è possibile e limitato solo a casi di sterilità o di infertilità inspiegate o documentate da atto medico.

Queste tecniche di procreazione medicalmente assistita comprende tutti quei procedimenti che precludono il trattamento di ovociti umani, di spermatozoi o embrioni nel caso in cui si lavora su di un progetto finalizzato all'ottenimento di una gravidanza.

I procedimenti di PMA includono:

- l'inseminazione omologa (in quanto severamente vietato far ricorso a tecniche di procreazione medicalmente assistita di tipo eterologo),
- la fecondazione in vitro ed il trasferimento embrionale, il trasferimento intratubarico dei gameti,
- la crioconservazione dei gameti.

Delle suddette tecniche noi ci occuperemo soltanto di:

- Fertilizzazione in vitro ed embriotrasfer (IVF-ET/ICSI);
- Crioconservazione dei gameti femminili.

Il principio base su cui ci si poggia nell'applicare queste tecniche è quello di procedere innanzi tutto ad interventi aventi un grado di invasività tecnico e psicologico meno gravosi possibili per i pazienti.

FIV: Consiste nel mettere in contatto gli spermatozoi con gli ovuli in laboratorio, sperando che lo spermatozoo penetri nell'ovulo e lo fertilizzi.



ICSI: Consiste nell'iniettare uno spermatozoo dentro l'ovulo mediante tecniche di micromanipolazione

In entrambi i casi ottenuta la fecondazione segue la divisione, ottenendo gli embrioni, i quali sono trasferiti in utero dove si annidano.

#### - *Fertilizzazione in vitro (IVF)*

##### *Indicazioni*

- Patologia tubarica;
- Endometriosi;
- Infertilità inspiegata
- Fattore maschile.

Oggi la FIVET è indicata in molte situazioni: che vanno dalla sterilità tubarica alla subfertilità maschile. È una metodica che dà buone possibilità di successo ma non è priva di limiti; inoltre è complessa, costosa e comporta scelte di tipo etico.

### *- Tecniche di prelievo ovocitario*

È importante prima dell'inizio di un ciclo di fecondazione assistita accertarsi del corretto funzionamento delle apparecchiature che devono essere successivamente utilizzati.

#### *Materiale utilizzato*

- Fiasche sterili
- Provette
- Piastre Petri
- Piastre nunc
- Pipette Pasteur di vetro;
- Puntali
- Vetrini
- Aghi di aspirazione ovocitaria;
- Aghi per micromanipolazione
- Catetere per embryo transfer

#### *Soluzioni e terreni di coltura utilizzati*

- H<sub>2</sub>O Bidistillata
- Olio Minerale Sterile
- Hearle con rosso fenolo: terreno di coltura di gameti utilizzabile per primo lavaggio degli ovociti dopo pick-up;
- IVF con rosso fenolo : Terreno di coltura di gameti ed embrioni, contenente bicarbonato viene equilibrato a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> prima dell'utilizzo;
- Ham's F10 con rosso fenolo, senza glutamina, per flushing ovocitario e per lavaggio spermatozoi;
- Sperm pep con rosso fenolo: il terreno di coltura di gameti, contiene bicarbonato e HEPES per migliorare la stabilità fuori dall'incubatore dove viene equilibrato a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> prima dell'utilizzo;

- PVP, 7% - ready to use solution;
- Hyaluronidase 80 U/ml in HTF w/hepes;
- PVP con rosso fenolo (Medium PVP 10 %):  
Soluzione ad alta viscosità per immobilizzare gli spermatozoi da prelevare per procedura ICSI

#### DAY 0

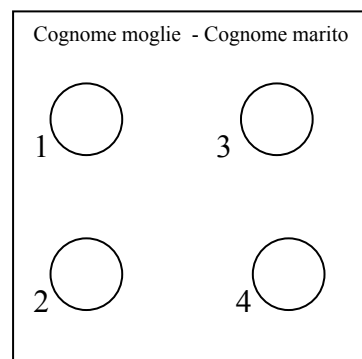
Prima dell'inizio dei pick-up si mettono a temperatura ambiente il PVP e la Hyaluronidase.

L'aspirazione dei follicoli è eseguita per mezzo di un ago a singolo lume ecoguidato. All'ago è applicata una pressione negativa (-80 / -100 millibar) regolata da una pompa di aspirazione (pompa di Kraft).

Gli ovociti recuperati sono raccolti nelle provette o alternativamente in fiasche sterili da 50 ml, e trasferiti in laboratorio.

Le provette contenenti gli ovociti vengono svuotate in piastre Falconi poste su piano riscaldato all'interno della cappa sterile a flusso laminare orizzontale e il liquido viene controllato allo stereomicroscopio per la ricerca degli ovociti. Si controlla allo stereomicroscopio il fondo della provetta prima di buttarla.

A questo punto gli ovociti vengono trasferiti nella piastra nunc a 4 pozzetti contenenti ognuno 500 µl di terreno di coltura ricoperto d'olio, in numero di 2/3 per ogni pozzetto, in incubatore e ivi mantenuti per circa 1 ora.

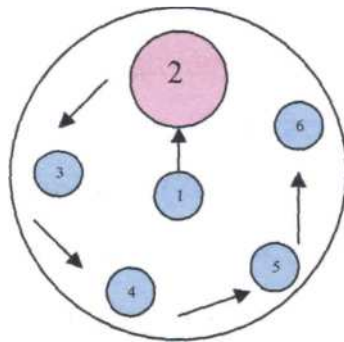


Piastra nunc a 4 pozzetti

Affinchè la procedura ICSI possa aver luogo, gli ovociti devono essere privati del cumulo ooforo e della corona radiata.

Si preparano piastre nunc 35 x 10 con microgocce di 50 µl, preparando 4 microgocce di terreno di coltura (FERT) e una goccia di terreno + hyaluronidase (40 UI/ml finale), o solo hyaluronidase (80 UI/ml finale) da segnare con un cerchio sotto la piastra mediante la matita vetrografica.

- 50 µl di FERT + 50 µl di hyaluronidase CH
- 50 µl di FERT



Piastra I (percorso ovociti)



Piastra II (disco di riposo)

Le piastre vengono rimesse in incubatore (down) per 15', si preparano intanto delle Pasteur assottigliate e si dispongono sotto cappa in ordine di diametro decrescente.



Si utilizza prima la piastra I che viene uscita dall' incubatore insieme alla nunc a 4 pozzetti, contenente gli ovociti, che vengono prelevati dal pozzetto e messi in una goccia di FERT (1) e poi passati in hyaluronidase (2), spipettati dolcemente fino all'eliminazione del cumulo (utilizzando Pasteur normale), e poi passati tutti assieme nelle gocce di lavaggio (3-4-5-6) mediante pipette assottigliate per allontanare il più possibile ogni traccia di enzima dagli ovociti.

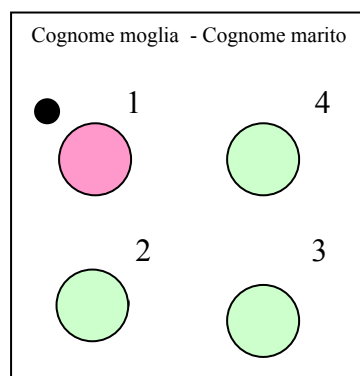
Spipettando con pasteur assottigliate, si ottiene la rimozione delle cellule follicolari, e gli ovociti vengono lasciati nella goccia di lavaggio (6).

A fine trattamento si aspira la goccia di Hyaluronidase. La procedura deve essere effettuata velocemente per non esporre gli ovociti alla soluzione di Hyaluronidase per più di 30 secondi.

Dopo l'eliminazione del cumulo ooforo gli ovociti vengono trasferiti nella piastra II, uno per goccia, classificati all'invertoscopio, e rimessi in incubatore.

Alternativamente la decoronizzazione può essere effettuata in piastre nunc a 4 pozzetti, contenenti nel pozzetto n°1 500 µl di hyaluronidase (80 UI/ml finale), contrassegnato con un puntino nero, e nei pozzetti n° 2-4 500 µl di terreno di coltura con hepes (HTF w/hepes). La piastra viene riscaldata sul termoblock a +37 °C, non in incubatore, e il procedimento di decoronizzazione è uguale.

-  Hyaluronidasi 80UI/ml finale
-  HTF con hepes



Piastra nunc (1- 4: percorso degli ovociti)

Gli ovociti adesso sono pronti per le procedure di congelamento



### 3.2. CRIOCONSERVAZIONE DEI GAMETI FEMMINILI

Prima di descrivere il protocollo di qualsiasi lavoro sulla crioconservazione ovocitaria è necessario mettere a fuoco dei concetti fondamentali di criobiologia.

I fattori importanti sono:

- Il controllo preciso della quota di raffreddamento e riscaldamento che determina il destino finale dell'acqua che è presente dentro la cellula, durante il processo di crioconservazione. Generalmente per differenti cellule c'è una quota di raffreddamento ottimale che varia in accordo con le dimensioni della cellula e con il tipo di cellula.
- I crioprotettori hanno il ruolo di proteggere la cellula durante il congelamento e di ridurre i danni causati dagli effetti di soluzione a quote lente di raffreddamento.
- Il seeding (induzione del primo nucleo di ghiaccio nella soluzione in cui vogliamo congelare le nostre cellule) serve a evitare il super raffreddamento ed a prevenire la formazione significativa di ghiaccio intracellulare.
- Inoltre è fondamentale la realizzazione di un equilibrio osmotico e termico durante il congelamento.

Durante il raffreddamento di cellule e tessuti si assiste alla comparsa di fenomeni chimico fisici che influiscono sulla vitalità del sistema che si vuole congelare.

Innanzitutto il raffreddamento (riduzione della temperatura) negli ovociti provoca :

1. riduzione delle attività enzimatiche
2. riduzione dei meccanismi di trasporto attivo

3. modificazioni della conformazione della membrana cellulare

4. danneggiamento della tubulina del fuso meiotico con conseguente depolimerizzazione

Questi danni possono essere ridotti esponendo gli ovociti a sostanze crioprotettive prima del congelamento e utilizzando basse velocità di raffreddamento.

- Con la riduzione della temperatura si ha un progressivo aumento della solubilità dei gas con aumento delle pressioni parziali di CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>.
- Continuando il raffreddamento si assiste alla comparsa di cristalli di ghiaccio. Comparsa del tutto casuale. Il primo nucleo di ghiaccio così può comparire sia all'esterno della cellula che al suo interno danneggiandola.
- Gli ovociti possono essere danneggiati anche dai cambiamenti improvvisi di temperatura che si producono al di sotto del punto di congelamento. Questo tipo di danno è chiamato cold-shock che può essere minimizzato raffreddando le cellule molto lentamente e aggiungendo al mezzo il crioprotettore.

### 3.2.1. CRIOPROTETTORI

Si pensa che gli agenti crioprotettivi prevengano la potenziale deleteria esposizione delle cellule ad elevate concentrazioni di elettroliti per mezzo della loro azione colligativa, riducendo la quantità di ghiaccio formato dentro la cellula a qualsiasi temperatura sotto lo zero.

I crioprotettori sono sostanze a diversa composizione chimica che hanno in comune un'elevata solubilità in acqua,

associata ad una tossicità dipendente dalla concentrazione di utilizzo.

La loro azione protettiva si esplica in vari modi:

- con un'azione diretta sulla membrana cellulare
- modificano l'ambiente intra ed extra cell. sostituendosi all'acqua e diminuendo la formazione di cristalli di ghiaccio.
- Abbassano il punto di congelamento della soluzione e permettono una maggiore disidratazione delle cell. durante il congelamento lento.

L'interazione tra crioprotettore e cellula è mediata da:

1. tempo di esposizione all'agente chimico
2. Temperatura a cui avviene l'esposizione
3. Stadio di divisione dell'embrione

#### *Sostanze più utilizzate*

Si dividono in due categorie :

1. Crioprotettori in grado di penetrare attraverso le membrane cellulari
2. Crioprotettori non in grado di penetrare attraverso le membrane cellulari.

CRIOPROTETTORI PENETRANTI (PM < 400)	CRIOPROTETTORI NON PENETRANTI (PM > 1000)
DMS (DIMETILSOLFOS SIDO)  GLICEROLO  PROH (1,2 PROPANDIOLO)  GLICOLE ETILENICO	ZUCCHERI  SACCAROSIO,FRUTTOSIO  GLUCOSIO,DESTROSIO  AMIDO  LIPOPROTEINE  PVP (POLIVINILPIRROLIDONE)

Se una cellula sospesa in un medium fisiologico, viene raffreddata progressivamente a temperature circa sotto lo zero, il ghiaccio si forma nella soluzione extracellulare.

Conseguentemente i soluti dissolti diventano più concentrati perché l'acqua viene rimossa sotto forma di ghiaccio. Quando la temperatura della sospensione cellulare si abbassa ancora, si forma più ghiaccio; ne risulta una soluzione extracellulare progressivamente più concentrata.

Se gli ovociti vengono raffreddati molto lentamente, il trasporto massivo di acqua all'esterno di essa riduce la differenza di potenziale chimico a livello della membrana, risultando in una progressiva disidratazione.

Se la cellula viene raffreddata molto rapidamente, potrebbe esserci poco tempo per il trasporto di acqua. Di conseguenza il citoplasma super-raffredderà ed eventualmente

congelerà all'interno della cellula.

Per evitare il super-raffreddamento e l'effetto negativo dei cambiamenti termici che comprometterebbero la sopravvivenza delle cellule, è possibile indurre la cristallizzazione del mezzo esterno in maniera controllata ad una temperatura prestabilita (-8°C) con un processo chiamato seeding.

### 3.2.2. CARATTERISTICHE DELL'OVOCITA UMANO

Le caratteristiche dell'ovocita importanti per il congelamento sono:

#### *Qualità e maturità*

La selezione degli ovociti adatti al congelamento, per qualità e maturità, è difficile dal momento che gli ovociti migliori vengono subito utilizzati per la fecondazione in vitro.

#### *Dimensioni*

È la caratteristica più importante. Nei mammiferi al momento dell'ovulazione è la cellula più grande (diametro che varia dai 70-80μ nel topo, a 130μ nei bovini e nell'uomo). Più sono grandi le dimensioni più è bassa la probabilità di sopravvivenza perché il tempo di equilibrio è tanto più lungo quanto è maggiore la massa citoplasmatica.

#### *Cumulo ooforo*

Nel congelamento si tende a ridurre meccanicamente o chimicamente il cumulo ooforo per incrementare le possibilità di sopravvivenza dopo congelamento / scongelamento.

*Tempo di esposizione al crioprotettore*

E' necessaria una più lunga esposizione al crioprotettore relativamente alle dimensioni dell'ovocita. Per contro deve esserci un rapido scambio di soluti per ridurre il tempo di esposizione.

**3.3. TECNICA DI CONGELAMENTO**

La tecnica del congelamento ha lo scopo di creare un gradiente di concentrazione che consente all'acqua di uscire dalla cellula e al crioprotettore di entrare, anche se più lentamente.

PROTOCOLLO DI PREPARAZIONE SOLUZIONI DI  
CONGELAMENTO-SCONGELAMENTO OVOCITI

*Preparazione*

Filtrare il PBS, con Millipore 0,22 µm, prima di utilizzarlo nella preparazione delle soluzioni;

*Caratteristiche tecniche soluzioni*

- PrOH: F.W.: 76,10; Densità: 1,04 gr/ml; Molarità soluzione madre: 13,666M.
- Saccarosio: F.W.: 342,3.

*Soluzioni di Congelamento*

(volume finale della singola soluzione = 5 ml):

Sol I: [PBS con siero al 30 %] = PBS: 3,5 ml + Siero: 1,5 ml

Sol II: [PBS + 1,5 M PrOH + siero 30 %] = PBS: 2,95 ml +  
PrOH: 0,55 ml + Siero: 1,5 ml;

Sol III: [PBS + 1,5 M PrOH + 0,3 M Saccarosio + siero 30 %] = PBS: 2,95 ml + PrOH: 0,55 ml + Siero: 1,5 ml + Saccarosio: 0,51 gr;

### *Materiale*

- Siringa da 1 ml
- Tubo di connessione con la paillett (1 cm)
- Paillettes per ovociti (2 ovocit per paillett)
- Pipette e puntali sterili
- Piastre Petri e piastre Nunc a 4 pozzetti
- 

### PROGRAMMA DI CONGELAMENTO

All'inizio la cellula è esposta a concentrazioni moderate di crioprotettori penetranti (propandiolo) e non penetranti (saccarosio) a temperatura compresa tra +10 e +30°C.

Si crea in questo modo il giusto gradiente di concentrazione che da inizio alla deidratazione e ad un ingresso più lento nella cellula del crioprotettore penetrante, che riporta il volume della cellula a quello iniziale. Questo processo di deidratazione dipende in modo critico dai caratteri di permeabilità della membrana, dalla sua composizione, dal rapporto tra superficie e volume della cellula, dalla temperatura e dalla differenza di pressione osmotica (rappresenta uno degli effetti critici del congelamento perché da esso può derivare la formazione di ghiaccio intracellulare).

Il raffreddamento della cellula inizia applicando un gradiente di temperatura piuttosto elevato (STEP 1: -2°C/min ) fino a raggiungere una temperatura leggermente inferiore al punto di congelamento (STEP 2: -4/-8°C). A questo punto si induce la formazione di un nucleo di ghiaccio nella soluzione extracellulare (STEP 3/4: il cosiddetto seeding). Cominciando dai -4/-8°C, ma applicando questa volta un gradiente di

diminuizione della temperatura molto più basso ( $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) si raggiungere la temperatura di  $-30^{\circ}\text{C}$  (STEP: 5).

In questo modo la formazione di ghiaccio extracellulare avviene molto lentamente mentre, via via che si verifica l'incorporazione dell'acqua nel ghiaccio che si forma, aumenta gradualmente la concentrazione dei soluti nella frazione non congelata. Si forma in questo modo un ulteriore gradiente osmotico che porta alla fuoriuscita di acqua dalla cellula e una ulteriore deidratazione.

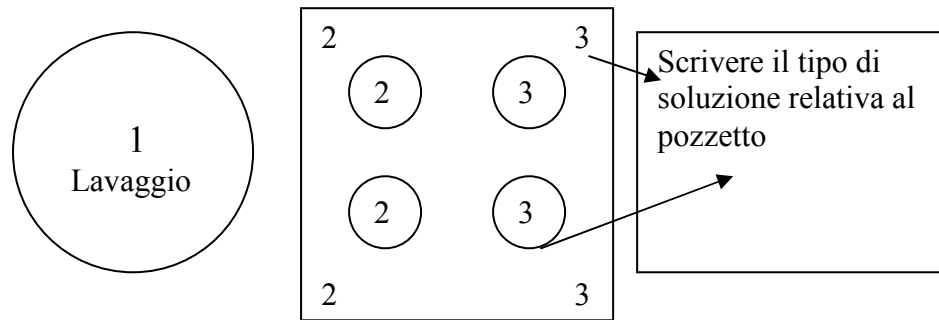
Se il congelamento si verifica con sufficiente lentezza, gran parte dell'acqua intracellulare fuoriesce e non si forma praticamente ghiaccio: tutto ciò accade fino a che non si raggiunge una temperatura compresa tra  $-30^{\circ}\text{C}$  e i  $-80^{\circ}\text{C}$  e prima di trasferire i campioni in azoto liquido. La temperatura viene portata lentamente dalla temperatura di  $-30^{\circ}\text{C}$  a  $-150^{\circ}\text{C}$  almeno ogni  $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (STEP 6) e poi tenere a  $-150^{\circ}\text{C}$  (End). Ma data l'impossibilità di un raffreddamento a  $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$  si può immergere direttamente in  $\text{LN}_2$  da STEP 3 oppure compiere lo STEP 4 ad una velocità di raffreddamento di  $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e fino a  $-100^{\circ}\text{C}$ .

Evidentemente si tratta di un gioco di equilibri: tempi abbastanza lunghi da consentire un'adeguata deidratazione, ma non così lunghi da esporre la cellula agli effetti tossici di elevate concentrazioni di soluti.

*Protocollo:*

- Preparare una siringa da 1 ml con il tubo di connessione per il caricamento;
- Preparare Paillettes in numero adeguato;
- Vengono utilizzate piastre Petri e piastre Nunc.





Piastra Petri

Piastre nunc

Nella piastra Petri da 3,5 ml vengono messi 3 ml della soluzione di lavaggio contenuta nel Vial 1.

Nel pozzetto 2 della Nunc vengono messi 400  $\mu$ l della soluzione 1,5 M PROH contenuta nel Vial 2.

Nel pozzetto 3 della Nunc vengono messi 400  $\mu$ l della soluzione 1,5 M PROH + 0,3 M saccarosio contenuta nel Vial 3.

- Fare equilibrare a T.A.;
- Screenare gli ovociti per valutarne la maturità nucleare.
- Trasferire gli ovociti dal terreno di coltura tamponato alla soluzione di lavaggio in piastra Petri 1 (soluzione 1) mediante una pipetta non assottigliata e screenarli nuovamente.
- Trasferire gli ovociti nella soluzione 2, nella piastra nunc, mantenere per 10'. (Il timer va fatto partire alla deposizione dei primi ovociti).
- Trasferire gli ovociti nella soluzione 3, nella piastra nunc, mantenere per 10-15'.
- Caricare nella paillette come segue:
  - a. Aspirare un volume pari a 2 cm di terreno Sol 3;
  - b. Lasciare una bolla d'aria di  $\frac{1}{4}$  cm;
  - c. Caricare terreno ed ovociti (9-10 cm);
  - d. Lasciare una bolla di  $\frac{1}{4}$  cm;
  - e. Aspirare terreno Sol 3;

f. Sigillare la paillett;

Le paillettes sono dei tubicini in plastica della lunghezza di circa 10 cm e del diametro di circa 2-3 mm che possono contenere circa 0.25ml di liquido.

Viene utilizzato un congelatore computerizzato ( Planer Krio 10 Serie II ) collegato ad una pompa per richiamo di azoto liquido. Nel computer vengono inserite le curve di discesa della temperatura che si vogliono utilizzare.

Successivamente poi le paillettes si ripongono in un cestello forato, poste orizzontalmente in modo ordinato, e si inserisce il cestello in un contenitore di LN<sub>2</sub>.

#### CURVA DI RAFFREDDAMENTO

La curva di raffreddamento è specifica ed ottimale per ogni tipo di cellula. I fattori che devono essere tenuti presenti sono:

1. Contenuto intracellulare di acqua
2. Permeabilità della membrana
3. Rapporto superficie / volume della cellula

Gli ovociti hanno un basso rapporto superficie/volume e una quantità relativamente alta di acqua intracellulare, necessitano perciò di un raffreddamento lento (da 0.1 a 1°C/min).

BIOTRONICS DB1

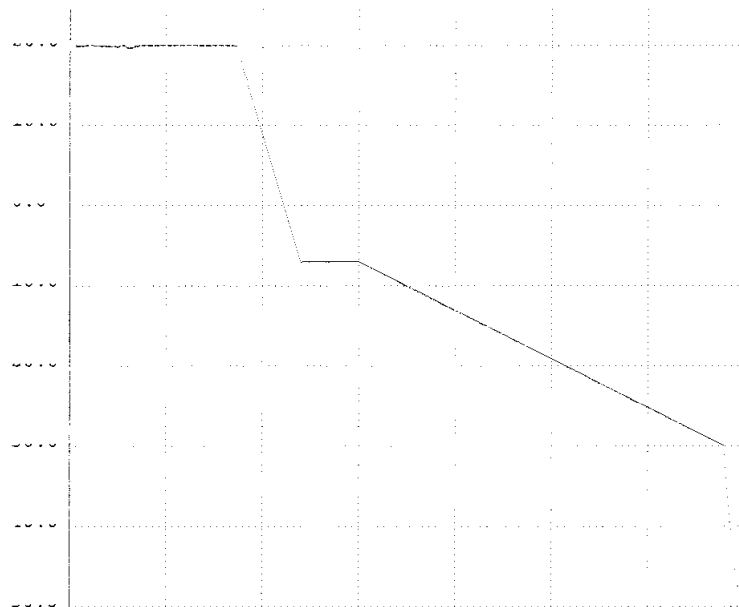
NUM. DI SERIE: 10081      BIOTRONICS DB1  
NUM. PROGRAMMA: 06      OVOCIT11  
N. ESECUZ: 31      DATA: 22/05/06 ORA: 21:21:23

<u>FREQUENZA</u>	<u>MIRA</u>
START	20°C
2.0°C/min	-07°C
HOLD	02MINS
SEED	-----
HOLD	08MINS
0.3°C/min	-30°C
FREEFALL	-50°C
END	

GIOV. BRACCHITTA  
USER 2  
USER 3

ESECUZIONE OK

TEMP. MAX 24.5°C      TEMP. MIN -50.0°C      TEMPO ES. 139m 10s



L'ovocita è una cellula che presenta una marcata sensibilità a basse temperature ed è per questo che si deve procedere con estrema accuratezza nel procedimento di congelamento per evitare il più possibile l'insorgenza di danni letali ma anche subletali che possono così abolirne il suo utilizzo successivo nella fecondazione dopo scongelamento.

Il danno maggiore osservato in seguito a trattamenti di crioconservazione riguarda: l'integrità del fuso meiotico in quanto l'esposizione a basse temperature viene ad essere danneggiata la tubulina (componente dei microtubuli del fuso) andando incontro ad un processo di depolimerizzazione.

### 3.3.1. ESPERIMENTO TEMPO-DIPENDENTE A BASSE TEMPERATURE

Un gruppo di ricerca (dell'Università di Torino) sono riusciti ad osservare le modifiche a cui il fuso è soggetto mediante esposizione tempo-dipendente a basse temperature.

Questi cambiamenti possono essere seguiti minuto per minuto per 10 minuti.

#### *Procedura*

Vengono presi in esame 2 ovociti di controllo (ovociti non trattati) e ovociti che sono stati rapidamente portati a 0°C e tenuti rispettivamente per 1 min, 2 min, ..., 10 min a questa temperatura.

Dopo il primo minuto il fuso esibisce una conformazione con un normale aspetto bipolare e microtubuli altamente fluorescenti paragonabili ai controlli. In questo ovocita come nei controlli, un polo è leggermente più appiattito dell'altro, e microtubuli che corrono da polo a polo sembrano essere intatti in termini di forma e fluorescenza. I cromosomi si trovano lungo il piano equatoriale.

Nell'ovocita congelato per due minuti entrambi i poli del fuso sembrano danneggiati, e i microtubuli fluorescenti che corrono da polo a polo sono ridotti in numero se paragonati a quelli del primo minuto.

*Dopo il terzo minuto* di raffreddamento l'ovocita presenta un numero considerevolmente ridotto di microtubuli fluorescenti

che corrono da polo a polo se paragonati con gli ovociti precedenti.

*Dopo quattro minuti* i microtubuli che correvano da polo a polo sono scomparsi e i fusi erano diventati più corti. Si nota una graduale riduzione nel numero e nella grandezza dei microtubuli fluorescenti contigui ai cromosomi.

*Dopo 10 minuti* a 0°C, il fuso è totalmente scomparso.

Negli ovociti di controllo naturalmente i fusi mostrano microtubuli altamente fluorescenti e i cromosomi sono allineati lungo il piano equatoriale.

### *Conclusione dell'esperimento*

Questo esperimento ci porta così a concludere e confermare che i fusi meiotici in metafase II degli ovociti umani sono sensibili all'esposizione a 0°C e che il danno al fuso è tempo-dipendente.

Come si è visto il fuso degli ovociti umani incomincia ad essere alterato entro i primi pochi minuti di congelamento; questo suggerisce che, per mantenere completamente normale i fusi, gli ovociti non dovrebbero essere esposti a temperature vicino a 0°C per più di uno o due minuti.

### **3.4. SCONGELAMENTO**

Lo scongelamento rappresenta l'ultima fase critica dell'intero processo di crioconservazione; consiste nel riportare a temperatura ambiente le cellule uovo ed è un procedimento altrettanto delicato e critico quanto congelarle, in quanto deve consentire alle cellule la capacità di recuperare le normali attività biologiche limitando quanto più possibile bruschi balzi termici.

Le modalità si basano su un aumento della temperatura molto rapido e su una esposizione a soluzioni di crioprotettore progressivamente più diluite per evitare la crescita di piccoli cristalli di ghiaccio eventualmente presenti e minimizzare gli stress osmotici: in questo modo la cellula si rigonfia ad ogni tappa di diluizione, ma non tanto da scoppiare. Lo scongelamento può essere lento o rapido. Le condizioni ottimali per lo scongelamento sono strettamente legate alla modalità di congelamento.

In generale se il raffreddamento lento viene interrotto a temperature relativamente elevata (  $-30^{\circ}\text{C}$ ,  $-40^{\circ}\text{C}$ ), 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.

### PROTOCOLLO SCONGELAMENTO OVOCITI

#### *Soluzioni di Scongelo*

Sol I: [PBS + 1,0 M PrOH + 0,3 M saccarosio + siero 30 %]

Sol II: [PBS + 0,5 M PrOH + 0,3 M saccarosio + siero 30 %]

Sol III: [PBS + 0,3 M Saccarosio + siero 30 %]

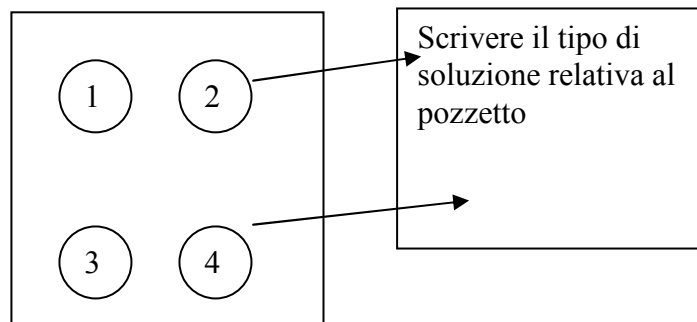
Sol IV: [PBS con siero al 30 %]

### *Materiali*

- Siringa da 1 ml
- Tubo di connessione con la paillett (1 cm)
- Pipette e puntali sterili
- Piastre Nunc a 4 pozzetti
- Forbici
- Bagnomaria riscaldato (30°C)

### *Procedura*

- Preparazione delle piastre (nunc a 4 pozzetti)



Viene utilizzata una piastra Nunc per ciascuna paillette da scongelare.

Nel pozzetto 1 vengono messi 400  $\mu$ l della soluzione 1.0 M di PROH + 0.3 M saccarosio (Sol 1).

Nel pozzetto 2 vengono messi 400  $\mu$ l della soluzione 0.5 M di PROH + 0.3 M saccarosio (Sol 2).

Nel pozzetto 3 vengono messi 400  $\mu$ l della soluzione 0.3 M saccarosio (Sol 3).

Nel pozzetto 4 vengono messi 400  $\mu$ l della soluzione di PBS (Sol 4).

*Protocollo*

- Preparare un recipiente con H<sub>2</sub>O a 30 °C, un recipiente in acciaio con azoto liquido, una forbice, carta assorbente, pinze, foglio dei tempi di scongelamento, penna e cronometro.
- Accendere il termostato (temperatura 37°C).
- Estrarre la paillette dal gobelet e tenerla 30 secondi all'aria asciugandola una o due volte con la carta assorbente e successivamente 40 secondi in H<sub>2</sub>O (30 °C). Asciugare nuovamente e tagliare con le forbici l'estremità con il filtro.
- Inserire la paillette nella siringa con il pistone preparato a scaricare il liquido e tagliare successivamente l'estremità della paillette con il tappino.
- Scaricare gli ovociti dalla paillette nel pozzetto 1, contenente la soluzione 1, visualizzandoli grazie ad uno stereomicroscopio, mantenere per 5 minuti.
- Trasferire gli ovociti nel pozzetto 2, soluzione 2, mantenere per 5 minuti,
- Trasferire nel pozzetto 3, soluzione 3, mantenere per 10 minuti.
- Trasferire nel pozzetto 4, soluzione 4, e mantenere per 10 minuti a T.<sub>ambiente</sub> e per 10 minuti in termostato a 37°C.
- Trasferire gli ovociti in terreno di coltura e lasciarli in un incubatore a CO<sub>2</sub> a 37°C. (Ad ogni pozzetto della nunc corrisponde il contenuto di una paillette scongelata)
- Valutare gli ovociti dopo scongelamento (sopravvissuti e degenerati) e riportare le valutazioni sul registro.
- Lasciare gli ovociti in incubatore (a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>) fino al momento dell'inseminazione, ICSI (circa 3-4 ore più tardi).



### 3.5. *TECNICHE DI COLORAZIONE*

Le tecniche di colorazione degli ovociti per la microscopia a fluorescenza richiedono una serie di passaggi di trattamenti sull'ovocita che successivamente verranno poi montati su speciali vetrini per la successiva visione al microscopio a fluorescenza.

L'ovocita scongelato viene fissato e permealizzato dopo averlo direttamente iniettato attraverso una micropipetta in una soluzione a 37°C contenente uno stabilizzante dei microtubuli 2% di formaldeide , 0.02% di Tritonx-100 in PBS e mantenuto in questa soluzione per 30 min.

Dopo aver fatto fissare gli ovociti per 30 min, vengono fatti lavare per 4 volte in una soluzione bloccata di PBS. Successivamente gli ovociti vengono incubati con anti  $\alpha$ -tubulina in PBS più 0.5% di BSA per un tempo di 45 minuti.

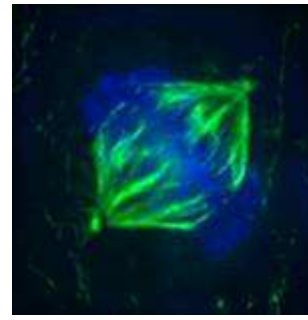
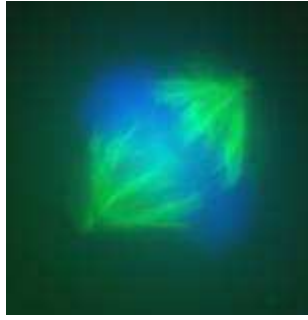
Dopo vengono sottoposti ad un lavaggio in Tween 20 0.01 % per 15 minuti, fatti incubare poi con Alexa Fluor (componente A e componente B in PBS) per 30 minuti e nuovamente sottoposti a lavaggi con Tween 20 0.01 % sempre per 15 minuti. Per colorare i cromosomi viene utilizzato lo ioduro di propidio in PBS e fatti incubare per 15 minuti.

Le fasi finali includono lavaggi in Tween 20 0.01% per 15 minuti e permanenza per 60 minuti in PBS con 0.5% di BSA.

Alla fine l'ovocita così trattato viene montato su di un vetrino polilisinato ed osservato al microscopio a fluorescenza.

#### 3.5.1. VALUTAZIONI MICROSCOPICHE

I risultati delle tecniche di colorazione mirano ad ottenere in genere i risultati osservati nelle sottostanti immagini. Nel caso in cui il risultato è negativo questo potrebbe essere dovuto alla depolimerizzazione dei microtubuli.



Tre sono i criteri di analisi per valutare microscopicamente gli ovociti:

1. osservazione della conformazione del fuso
2. osservazione dell'allineamento dei cromosomi nel piano equatoriale
3. osservazione della localizzazione dei microtubuli fluorescenti.

### 3.5.2. FOTOMICROSCOPIA

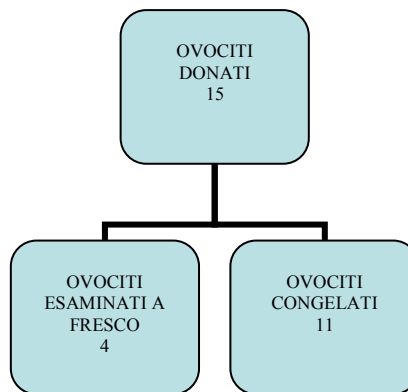
Gli ovociti vengono fotografati con una fotomicroscopia Zeiss Axioplone dotata di epifluorescenza a luce ultravioletta e con eccitazione corrispondente a filtri di barriera. L'orientamento casuale di un asse produce fotografie nelle quali l'asse fu visto dal polo, o a 90° dal polo così che il piano

equatoriale viene visto sull'orlo. Selezionate le preparazioni microscopiche queste vengono impressionate su un Silicon Graphics Work Station con una Delta Vision Deconvoluted Microscope (microscopio con un sezionamento ottico ad ampio campo).

Le immagini vengono poi composte usando Adobe 5.0 Education Version su un computer.

#### 4. RISULTATI E DISCUSSIONI

Nel lavoro che è stato eseguito presso il Centro di Diagnosi e Cura della sterilità di Ragusa nel semestre gennaio – giugno 2006 abbiamo ricevuto in donazione ai fini di ricerca scientifica, previa firma di consensi informati, n° 15 ovociti, di questi 4 sono stati esaminati a fresco, il resto sono stati congelati.



Negli ovociti esaminati a fresco non siamo riusciti ad ottenere la visualizzazione del fuso meiotico.

Secondo dati di lettura è emerso che la visione del fuso si ha solo in una percentuale del 40% mentre la possibilità purtroppo di non trovare il fuso è del ben 60% dato anche confermato da un altro gruppo di colleghi che hanno lavorato sullo stesso argomento. Gli ovociti congelati non sono stati ancora utilizzati e saranno disponibili per ulteriori esperimenti futuri ai fini di mettere a punto questa tecnica di osservazione.

I risultati ottenuti ci fanno essere comunque ottimisti riguardo il congelamento degli ovociti umani che rappresenta uno degli strumenti che contribuiscono a migliorare ed a risolvere problemi di infertilità.

Con la speranza che piccoli cambiamenti delle procedure di crioconservazione possano migliorare i risultati della sopravvivenza degli ovociti e danneggiare il meno possibile il fuso.

## **5. CONCLUSIONE**

I dati ottenuti ci danno modo di pensare che le motivazioni per cui abbiamo cominciato questo tipo di lavoro erano quelle di osservare eventuali danni al fuso nell'ovocita dopo congelamento. Ma purtroppo per l'esiguo n° di ovociti osservati non è stato possibile validare il nostro protocollo e quindi questa tecnica per essere definita affidabile necessita ancora di accurate modifiche e nuove sperimentazioni.

Comunque anche se non abbiamo dimostrato che il nostro protocollo di congelamento è una tecnica applicabile in maniera routinaria, abbiamo ottenuto la prima gravidanza da ovociti congelati provenienti dal programma di congelamento da noi utilizzato "Primo caso in Sicilia".

## **6. Bibliografia**

Hum Reprod. 1995 Oct. - Kazem R, Thompson LA, Srikantharajah A, Laing MA, Hamilton MP, Templeton A. - University Department of Obstetrics and Gynaecology, Aberdeen Maternity Hospital, UK.

Fertil Steril. 2001 Feb.- Cobo A, Rubio C, Gerli S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. - Instituto Valenciano de Infertilidad, Valencia, Spain.

Hum Reprod. 2001 Mar - Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. - IVF Center, Human Reproductive Medicine Unit, Institute of Obstetrics and Gynecology, University of Bologna, Bologna, Italy.

Semin Reprod Med. 2002 Feb. - Winger JD, Kort HI. - Reproductive Biology Associates, Atlanta, USA.

Mol Cell Endocrinol. 2003 Apr 28 - Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. - Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine and University Hospital, National Taiwan University, Taiwan.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004 Apr 5 - Georgia Reproductive Specialists, USA.

J Assist Reprod Genet. 2004 Aug. - Fuchinoue K, Fukunaga N, Chiba S, Nakajo Y, Yagi A, Kyono K. - Department of Gynecology and Urology, Ladies Clinic Kyono, Japan.

Beijing Da Xue Xue Bao. 2004 Dec - Center of Reproduction and Genetics, Peking University First Hospital, China.

J Natl Cancer Inst Monogr. 2005 - Center for Reproductive Medicine and Infertility, Weill Medical College, Cornell University, New York, USA.

Hum Reprod. 2005 Jul - Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chang LJ, Tsai YY, Yang YS. - Department of Obstetrics and Gynecology, National Taiwan University Hospital and College of Medicine, Taipei, Taiwan.

Semin Reprod Med. 2005 Aug. - Rao GD, Tan SL. - Clinical Research Fellow, McGill University, Royal Victoria Hospital, Montreal, Canada.

Reprod Biomed Online. 2005 Sep. - Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. - Kato Ladies' Clinic, Tokyo, Japan.

Fertil Steril. 2005 Oct - Department of Gynecology and Urology, Ladies Clinic Kyono, Miyagi, Japan.

Reprod Biomed Online. 2005 Oct - Coticchio G, Bonu MA, Bianchi V, Flamigni C, Borini A. - Tecnobios Procreazione, Bologna, Italy.

Semin Reprod Med. 2005 Nov - Nawroth F, Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V, Liebermann M, Tucker MJ, Liebermann J. - Centre of Reproductive Medicine and Gynecologic Endocrinology, Hamburg, Germany.

## **7. ALLEGATI**

Legge 19 febbraio 2004, n. 40

"Norme in materia di procreazione medicalmente assistita"

pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 45 del 24 febbraio 2004

---

### CAPO I PRINCÌPI GENERALI

#### ART. 1. (Finalità).

1. Al fine di favorire la soluzione dei problemi riproduttivi derivanti dalla sterilità o dalla infertilità umana è consentito il ricorso alla procreazione medicalmente assistita, alle condizioni e secondo le modalità previste dalla presente legge, che assicura i diritti di tutti i soggetti coinvolti, compreso il concepito.
2. Il ricorso alla procreazione medicalmente assistita è consentito qualora non vi siano altri metodi terapeutici efficaci per rimuovere le cause di sterilità o infertilità.

#### ART. 2. (Interventi contro la sterilità e la infertilità).

1. Il Ministro della salute, sentito il Ministro dell'istruzione, dell'università e della ricerca, può promuovere ricerche sulle cause patologiche, psicologiche, ambientali e sociali dei fenomeni della sterilità e della infertilità e favorire gli interventi necessari per rimuoverle nonché per ridurre l'incidenza, può

incentivare gli studi e le ricerche sulle tecniche di crioconservazione dei gameti e può altresì promuovere campagne di informazione e di prevenzione dei fenomeni della sterilità e della infertilità.

2. Per le finalità di cui al comma 1 è autorizzata la spesa massima di 2 milioni di euro a decorrere dal 2004.

3. All'onere derivante dall'attuazione del comma 2 si provvede mediante corrispondente riduzione dello stanziamento iscritto, ai fini del bilancio triennale 2004-2006, nell'ambito dell'unità previsionale di base di parte corrente "Fondo speciale" dello stato di previsione del Ministero dell'economia e delle finanze per l'anno 2004, allo scopo parzialmente utilizzando l'accantonamento relativo al Ministero della salute. Il Ministro dell'economia e delle finanze è autorizzato ad apportare, con propri decreti, le occorrenti variazioni di bilancio.

### ART. 3.

(Modifica alla legge 29 luglio 1975, n. 405).

1. Al primo comma dell'articolo 1 della legge 29 luglio 1975, n. 405, sono aggiunte, in fine, le seguenti lettere:

"d-bis) l'informazione e l'assistenza riguardo ai problemi della sterilità e della infertilità umana, nonché alle tecniche di procreazione medicalmente assistita;

d-ter) l'informazione sulle procedure per l'adozione e l'affidamento familiare".

2. Dall'attuazione del presente articolo non devono derivare nuovi o maggiori oneri a carico della finanza pubblica.



## CAPO II

### ACCESSO ALLE TECNICHE

#### ART. 4.

(Accesso alle tecniche).

1. Il ricorso alle tecniche di procreazione medicalmente assistita è consentito solo quando sia accertata l'impossibilità di rimuovere altrimenti le cause impeditive della procreazione ed è comunque circoscritto ai casi di sterilità o di infertilità inspiegate documentate da atto medico nonché ai casi di sterilità o di infertilità da causa accertata e certificata da atto medico.

2. Le tecniche di procreazione medicalmente assistita sono applicate in base ai seguenti principi:

a) gradualità, al fine di evitare il ricorso ad interventi aventi un grado di invasività tecnico e psicologico più gravoso per i destinatari, ispirandosi al principio della minore invasività;

b) consenso informato, da realizzare ai sensi dell'articolo 6.

3. È vietato il ricorso a tecniche di procreazione medicalmente assistita di tipo eterologo.

#### ART. 5.

(Requisiti soggettivi).

1. Fermo restando quanto stabilito dall'articolo 4, comma 1, possono accedere alle tecniche di procreazione medicalmente assistita coppie di maggiorenni di sesso diverso, coniugate o conviventi, in età potenzialmente fertile, entrambi viventi.

#### ART. 6.

(Consenso informato).

1. Per le finalità indicate dal comma 3, prima del ricorso ed in ogni fase di applicazione delle tecniche di procreazione

medicalmente assistita il medico informa in maniera dettagliata i soggetti di cui all'articolo 5 sui metodi, sui problemi bioetici e sui possibili effetti collaterali sanitari e psicologici conseguenti all'applicazione delle tecniche stesse, sulle probabilità di successo e sui rischi dalle stesse derivanti, nonché sulle relative conseguenze giuridiche per la donna, per l'uomo e per il nascituro. Alla coppia deve essere prospettata la possibilità di ricorrere a procedure di adozione o di affidamento ai sensi della legge 4 maggio 1983, n. 184, e successive modificazioni, come alternativa alla procreazione medicalmente assistita. Le informazioni di cui al presente comma e quelle concernenti il grado di invasività delle tecniche nei confronti della donna e dell'uomo devono essere fornite per ciascuna delle tecniche applicate e in modo tale da garantire il formarsi di una volontà consapevole e consapevolmente espressa.

2. Alla coppia devono essere prospettati con chiarezza i costi economici dell'intera procedura qualora si tratti di strutture private autorizzate.

3. La volontà di entrambi i soggetti di accedere alle tecniche di procreazione medicalmente assistita è espressa per iscritto congiuntamente al medico responsabile della struttura, secondo modalità definite con decreto dei Ministri della giustizia e della salute, adottato ai sensi dell'articolo 17, comma 3, della legge 23 agosto 1988, n. 400, entro tre mesi dalla data di entrata in vigore della presente legge. Tra la manifestazione della volontà e l'applicazione della tecnica deve intercorrere un termine non inferiore a sette giorni. La volontà può essere revocata da ciascuno dei soggetti indicati dal presente comma fino al momento della fecondazione dell'ovulo.

4. Fatti salvi i requisiti previsti dalla presente legge, il medico responsabile della struttura può decidere di non procedere alla procreazione medicalmente assistita, esclusivamente per motivi

di ordine medico-sanitario. In tale caso deve fornire alla coppia motivazione scritta di tale decisione.

5. Ai richiedenti, al momento di accedere alle tecniche di procreazione medicalmente assistita, devono essere esplicitate con chiarezza e mediante sottoscrizione le conseguenze giuridiche di cui all'articolo 8 e all'articolo 9 della presente legge.

#### ART. 7.

(Linee guida).

1. Il Ministro della salute, avvalendosi dell'Istituto superiore di sanità, e previo parere del Consiglio superiore di sanità, definisce, con proprio decreto, da emanare entro tre mesi dalla data di entrata in vigore della presente legge, linee guida contenenti l'indicazione delle procedure e delle tecniche di procreazione medicalmente assistita.

2. Le linee guida di cui al comma 1 sono vincolanti per tutte le strutture autorizzate.

3. Le linee guida sono aggiornate periodicamente, almeno ogni tre anni, in rapporto all'evoluzione tecnico-scientifica, con le medesime procedure di cui al comma 1.

#### CAPO III

#### DISPOSIZIONI CONCERNENTI LA TUTELA DEL NASCITURO

#### ART. 8.

(Stato giuridico del nato).

1. I nati a seguito dell'applicazione delle tecniche di procreazione medicalmente assistita hanno lo stato di figli legittimi o di figli riconosciuti della coppia che ha espresso la

volontà di ricorrere alle tecniche medesime ai sensi dell'articolo 6.

ART. 9.

(Divieto del disconoscimento della paternità e dell'anonimato della madre).

1. Qualora si ricorra a tecniche di procreazione medicalmente assistita di tipo eterologo in violazione del divieto di cui all'articolo 4, comma 3, il coniuge o il convivente il cui consenso è ricavabile da atti concludenti non può esercitare l'azione di disconoscimento della paternità nei casi previsti dall'articolo 235, primo comma, numeri 1) e 2), del codice civile, né l'impugnazione di cui all'articolo 263 dello stesso codice.

2. La madre del nato a seguito dell'applicazione di tecniche di procreazione medicalmente assistita non può dichiarare la volontà di non essere nominata, ai sensi dell'articolo 30, comma 1, del regolamento di cui al decreto del Presidente della Repubblica 3 novembre 2000, n. 396.

3. In caso di applicazione di tecniche di tipo eterologo in violazione del divieto di cui all'articolo 4, comma 3, il donatore di gameti non acquisisce alcuna relazione giuridica parentale con il nato e non può far valere nei suoi confronti alcun diritto né essere titolare di obblighi.

CAPO IV

REGOLAMENTAZIONE DELLE STRUTTURE AUTORIZZATE  
ALL'APPLICAZIONE DELLE TECNICHE DI PROCREAZIONE  
MEDICALMENTE ASSISTITA

ART. 10.

(Strutture autorizzate).

1. Gli interventi di procreazione medicalmente assistita sono realizzati nelle strutture pubbliche e private autorizzate dalle regioni e iscritte al registro di cui all'articolo 11.
2. Le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano definiscono con proprio atto, entro tre mesi dalla data di entrata in vigore della presente legge:
  - a) i requisiti tecnico-scientifici e organizzativi delle strutture;
  - b) le caratteristiche del personale delle strutture;
  - c) i criteri per la determinazione della durata delle autorizzazioni e dei casi di revoca delle stesse;
  - d) i criteri per lo svolgimento dei controlli sul rispetto delle disposizioni della presente legge e sul permanere dei requisiti tecnico-scientifici e organizzativi delle strutture.

ART. 11.

(Registro).

1. È istituito, con decreto del Ministro della salute, presso l'Istituto superiore di sanità, il registro nazionale delle strutture autorizzate all'applicazione delle tecniche di procreazione medicalmente assistita, degli embrioni formati e dei nati a seguito dell'applicazione delle tecniche medesime.
2. L'iscrizione al registro di cui al comma 1 è obbligatoria.
3. L'Istituto superiore di sanità raccoglie e diffonde, in collaborazione con gli osservatori epidemiologici regionali, le informazioni necessarie al fine di consentire la trasparenza e la pubblicità delle tecniche di procreazione medicalmente assistita adottate e dei risultati conseguiti.
4. L'Istituto superiore di sanità raccoglie le istanze, le informazioni, i suggerimenti, le proposte delle società

scientifiche e degli utenti riguardanti la procreazione medicalmente assistita.

5. Le strutture di cui al presente articolo sono tenute a fornire agli osservatori epidemiologici regionali e all'Istituto superiore di sanità i dati necessari per le finalità indicate dall'articolo 15 nonché ogni altra informazione necessaria allo svolgimento delle funzioni di controllo e di ispezione da parte delle autorità competenti.

6. All'onere derivante dall'attuazione del presente articolo, determinato nella misura massima di 154.937 euro a decorrere dall'anno 2004, si provvede mediante corrispondente riduzione dello stanziamento iscritto, ai fini del bilancio triennale 2004-2006, nell'ambito dell'unità previsionale di base di parte corrente "Fondo speciale" dello stato di previsione del Ministero dell'economia e delle finanze per l'anno 2004, allo scopo parzialmente utilizzando l'accantonamento relativo al Ministero della salute. Il Ministro dell'economia e delle finanze è autorizzato ad apportare, con propri decreti, le occorrenti variazioni di bilancio.

## CAPO V

### DIVIETI E SANZIONI

#### ART. 12.

(Divieti generali e sanzioni).

1. Chiunque a qualsiasi titolo utilizza a fini procreativi gameti di soggetti estranei alla coppia richiedente, in violazione di quanto previsto dall'articolo 4, comma 3, è punito con la sanzione amministrativa pecuniaria da 300.000 a 600.000 euro.

2. Chiunque a qualsiasi titolo, in violazione dell'articolo 5, applica tecniche di procreazione medicalmente assistita a coppie i cui componenti non siano entrambi viventi o uno dei cui

componenti sia minorenne ovvero che siano composte da soggetti dello stesso sesso o non coniugati o non conviventi è punito con la sanzione amministrativa pecuniaria da 200.000 a 400.000 euro.

3. Per l'accertamento dei requisiti di cui al comma 2 il medico si avvale di una dichiarazione sottoscritta dai soggetti richiedenti. In caso di dichiarazioni mendaci si applica l'articolo 76, commi 1 e 2, del testo unico delle disposizioni legislative e regolamentari in materia di documentazione amministrativa, di cui al decreto del Presidente della Repubblica 28 dicembre 2000, n. 445.

4. Chiunque applica tecniche di procreazione medicalmente assistita senza avere raccolto il consenso secondo le modalità di cui all'articolo 6 è punito con la sanzione amministrativa pecuniaria da 5.000 a 50.000 euro.

5. Chiunque a qualsiasi titolo applica tecniche di procreazione medicalmente assistita in strutture diverse da quelle di cui all'articolo 10 è punito con la sanzione amministrativa pecuniaria da 100.000 a 300.000 euro.

6. Chiunque, in qualsiasi forma, realizza, organizza o pubblicizza la commercializzazione di gameti o di embrioni o la surrogazione di maternità è punito con la reclusione da tre mesi a due anni e con la multa da 600.000 a un milione di euro.

7. Chiunque realizza un processo volto ad ottenere un essere umano discendente da un'unica cellula di partenza, eventualmente identico, quanto al patrimonio genetico nucleare, ad un altro essere umano in vita o morto, è punito con la reclusione da dieci a venti anni e con la multa da 600.000 a un milione di euro. Il medico è punito, altresì, con l'interdizione perpetua dall'esercizio della professione.

8. Non sono punibili l'uomo o la donna ai quali sono applicate le tecniche nei casi di cui ai commi 1, 2, 4 e 5.

9. È disposta la sospensione da uno a tre anni dall'esercizio professionale nei confronti dell'esercente una professione sanitaria condannato per uno degli illeciti di cui al presente articolo, salvo quanto previsto dal comma 7.

10. L'autorizzazione concessa ai sensi dell'articolo 10 alla struttura al cui interno è eseguita una delle pratiche vietate ai sensi del presente articolo è sospesa per un anno. Nell'ipotesi di più violazioni dei divieti di cui al presente articolo o di recidiva l'autorizzazione può essere revocata.

## CAPO VI

### MISURE DI TUTELA DELL'EMBRIONE

#### ART. 13.

(Sperimentazione sugli embrioni umani).

1. È vietata qualsiasi sperimentazione su ciascun embrione umano.

2. La ricerca clinica e sperimentale su ciascun embrione umano è consentita a condizione che si perseguano finalità esclusivamente terapeutiche e diagnostiche ad essa collegate volte alla tutela della salute e allo sviluppo dell'embrione stesso, e qualora non siano disponibili metodologie alternative.

3. Sono, comunque, vietati:

a) la produzione di embrioni umani a fini di ricerca o di sperimentazione o comunque a fini diversi da quello previsto dalla presente legge;

b) ogni forma di selezione a scopo eugenetico degli embrioni e dei gameti ovvero interventi che, attraverso tecniche di



selezione, di manipolazione o comunque tramite procedimenti artificiali, siano diretti ad alterare il patrimonio genetico dell'embrione o del gamete ovvero a predeterminarne caratteristiche genetiche, ad eccezione degli interventi aventi finalità diagnostiche e terapeutiche, di cui al comma 2 del presente articolo;

c) interventi di clonazione mediante trasferimento di nucleo o di scissione precoce dell'embrione o di ectogenesi sia a fini procreativi sia di ricerca;

d) la fecondazione di un gamete umano con un gamete di specie diversa e la produzione di ibridi o di chimere.

4. La violazione dei divieti di cui al comma 1 è punita con la reclusione da due a sei anni e con la multa da 50.000 a 150.000 euro. In caso di violazione di uno dei divieti di cui al comma 3 la pena è aumentata. Le circostanze attenuanti concorrenti con le circostanze aggravanti previste dal comma 3 non possono essere ritenute equivalenti o prevalenti rispetto a queste.

5. È disposta la sospensione da uno a tre anni dall'esercizio professionale nei confronti dell'esercente una professione sanitaria condannato per uno degli illeciti di cui al presente articolo.

#### ART. 14.

(Limiti all'applicazione delle tecniche sugli embrioni).

1. È vietata la crioconservazione e la soppressione di embrioni, fermo restando quanto previsto dalla legge 22 maggio 1978, n. 194.

2. Le tecniche di produzione degli embrioni, tenuto conto dell'evoluzione tecnico-scientifica e di quanto previsto dall'articolo 7, comma 3, non devono creare un numero di

embrioni superiore a quello strettamente necessario ad un unico e contemporaneo impianto, comunque non superiore a tre.

3. Qualora il trasferimento nell'utero degli embrioni non risulti possibile per grave e documentata causa di forza maggiore relativa allo stato di salute della donna non prevedibile al momento della fecondazione è consentita la crioconservazione degli embrioni stessi fino alla data del trasferimento, da realizzare non appena possibile.

4. Ai fini della presente legge sulla procreazione medicalmente assistita è vietata la riduzione embrionaria di gravidanze plurime, salvo nei casi previsti dalla legge 22 maggio 1978, n. 194.

5. I soggetti di cui all'articolo 5 sono informati sul numero e, su loro richiesta, sullo stato di salute degli embrioni prodotti e da trasferire nell'utero.

6. La violazione di uno dei divieti e degli obblighi di cui ai commi precedenti è punita con la reclusione fino a tre anni e con la multa da 50.000 a 150.000 euro.

7. È disposta la sospensione fino ad un anno dall'esercizio professionale nei confronti dell'esercente una professione sanitaria condannato per uno dei reati di cui al presente articolo.

8. È consentita la crioconservazione dei gameti maschili e femminili, previo consenso informato e scritto.

9. La violazione delle disposizioni di cui al comma 8 è punita con la sanzione amministrativa pecuniaria da 5.000 a 50.000 euro.

CAPO VII

DISPOSIZIONI FINALI E TRANSITORIE

ART. 15.

(Relazione al Parlamento).

1. L'Istituto superiore di sanità predispone, entro il 28 febbraio di ciascun anno, una relazione annuale per il Ministro della salute in base ai dati raccolti ai sensi dell'articolo 11, comma 5, sull'attività delle strutture autorizzate, con particolare riferimento alla valutazione epidemiologica delle tecniche e degli interventi effettuati.

2. Il Ministro della salute, sulla base dei dati indicati al comma 1, presenta entro il 30 giugno di ogni anno una relazione al Parlamento sull'attuazione della presente legge.

ART. 16.

(Obiezione di coscienza).

1. Il personale sanitario ed esercente le attività sanitarie ausiliarie non è tenuto a prendere parte alle procedure per l'applicazione delle tecniche di procreazione medicalmente assistita disciplinate dalla presente legge quando sollevi obiezione di coscienza con preventiva dichiarazione. La dichiarazione dell'obiettore deve essere comunicata entro tre mesi dalla data di entrata in vigore della presente legge al direttore dell'azienda unità sanitaria locale o dell'azienda ospedaliera, nel caso di personale dipendente, al direttore sanitario, nel caso di personale dipendente da strutture private autorizzate o accreditate.

2. L'obiezione può essere sempre revocata o venire proposta anche al di fuori dei termini di cui al comma 1, ma in tale caso la dichiarazione produce effetto dopo un mese dalla sua presentazione agli organismi di cui al comma 1.

3. L'obiezione di coscienza esonera il personale sanitario ed esercente le attività sanitarie ausiliarie dal compimento delle procedure e delle attività specificatamente e necessariamente dirette a determinare l'intervento di procreazione medicalmente assistita e non dall'assistenza antecedente e conseguente l'intervento.

ART. 17.

(Disposizioni transitorie).

1. Le strutture e i centri iscritti nell'elenco predisposto presso l'Istituto superiore di sanità ai sensi dell'ordinanza del Ministro della sanità del 5 marzo 1997, pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 55 del 7 marzo 1997, sono autorizzati ad applicare le tecniche di procreazione medicalmente assistita, nel rispetto delle disposizioni della presente legge, fino al nono mese successivo alla data di entrata in vigore della presente legge.

2. Entro trenta giorni dalla data di entrata in vigore della presente legge, le strutture e i centri di cui al comma 1 trasmettono al Ministero della salute un elenco contenente l'indicazione numerica degli embrioni prodotti a seguito dell'applicazione di tecniche di procreazione medicalmente assistita nel periodo precedente la data di entrata in vigore della presente legge, nonché, nel rispetto delle vigenti disposizioni sulla tutela della riservatezza dei dati personali, l'indicazione nominativa di coloro che hanno fatto ricorso alle tecniche medesime a seguito delle quali sono stati formati gli embrioni. La violazione della disposizione del presente comma è punita con la sanzione amministrativa pecuniaria da 25.000 a 50.000 euro.

3. Entro tre mesi dalla data di entrata in vigore della presente legge il Ministro della salute, avvalendosi dell'Istituto superiore di sanità, definisce, con proprio decreto, le modalità e i termini di conservazione degli embrioni di cui al comma 2.

ART. 18.

(Fondo per le tecniche di procreazione medicalmente assistita).

1. Al fine di favorire l'accesso alle tecniche di procreazione medicalmente assistita da parte dei soggetti di cui all'articolo 5, presso il Ministero della salute è istituito il Fondo per le tecniche di procreazione medicalmente assistita. Il Fondo è ripartito tra le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano sulla base di criteri determinati con decreto del Ministro della salute, da emanare entro sessanta giorni dalla data di entrata in vigore della presente legge, sentita la Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano.

2. Per la dotazione del Fondo di cui al comma 1 è autorizzata la spesa di 6,8 milioni di euro a decorrere dall'anno 2004.

3. All'onere derivante dall'attuazione del presente articolo si provvede mediante corrispondente riduzione dello stanziamento iscritto, ai fini del bilancio triennale 2004-2006, nell'ambito dell'unità previsionale di base di parte corrente "Fondo speciale" dello stato di previsione del Ministero dell'economia e delle finanze per l'anno 2004, allo scopo parzialmente utilizzando l'accantonamento relativo al Ministero medesimo. Il Ministro dell'economia e delle finanze è autorizzato ad apportare, con propri decreti, le occorrenti variazioni di bilancio.