

SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	1
ANATOMIA DELL'APPARATO RIPRODUTTIVO FEMMINILE	3
OVAIE	4
TUBE UTERINE	4
UTERO	5
FISIOLOGIA DELL'APPARATO RIPRODUTTIVO FEMMINILE.....	7
GAMETE FEMMINILE	7
MEIOSI.....	9
<i>Fasi della prima divisione meiotica (MI)</i>	10
<i>Fasi della seconda divisione meiotica (MII)</i>	11
OOGENESI E CICLO OVARICO	12
CICLO MESTRUALE.....	15
ENDOCRINOLOGIA RIPRODUTTIVA FEMMINILE	16
CONTROLLO NEUROENDOCRINO DELLA FASE FOLLICOLARE	16
CONTROLLO NEUROENDOCRINO DELL'OVULAZIONE.....	18
CONTROLLO NEUROENDOCRINO DELLA FASE LUTEINICA	18
CONTROLLO NEUROENDOCRINO DELLA FASE MESTRUALE.....	19
LA PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA IN ITALIA	21
SELEZIONE OVOCITARIA	27
VALUTAZIONE DI PARAMETRI MORFOLOGICI SOGGETTIVI.....	27
IL POLOSCOPIO.....	32
<i>Fuso meiotico</i>	35
<i>Zona pellucida</i>	35
VALUTAZIONE DI PARAMETRI OGGETTIVI	36
DISEGNO SPERIMENTALE	41
OSSERVAZIONI	41
IPOTESI.....	43
MATERIALI E METODI	44
<i>Biopsia del primo globulo polare e fissaggio</i>	45
<i>Colorazione del DNA con Propidio Ioduro</i>	45
<i>Colorazione del DNA con 4'.6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI)</i>	46
<i>Valutazione della ritardanza del fuso meiotico di ovociti umani in seguito ad ICSI</i>	48
RISULTATI	50
DISCUSSIONE	55

CONCLUSIONI.....	59
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUZIONE

La corretta valutazione della qualità ovocitaria è uno degli aspetti cruciali per l'esito delle tecniche di fecondazione assistita.

Questo aspetto diventa ancora più rilevante nei casi in cui la legge imponga la selezione e l'inseminazione di pochi ovociti per paziente. E' il caso dell'Italia, dove alla luce della nuova legislazione in materia di procreazione medicalmente assistita (legge 19 febbraio 2004, n. 40) la valutazione della qualità degli ovociti diventa di fondamentale importanza per la selezione di cellule uovo che potrebbero avere un maggiore potenziale di sviluppo e dare quindi una più elevata probabilità di gravidanza.

Con l'utilizzo dei tradizionali microscopi si è tentato di identificare parametri morfologici che potessero predire il potenziale di sviluppo dell'ovocita, come l'aspetto del citoplasma, lo spessore della zona pellucida, la morfologia del globulo polare.

I risultati di questi studi (Xia et al. 1997; Serhal et al. 1997; Balaban et al. 1998; Ebner et al. 2000) portano però alla conclusione che nessuna caratteristica morfologica può essere utilizzata con certezza per la selezione di ovociti di buona qualità.

Negli ultimi anni è stato possibile affiancare allo studio morfologico della cellula uovo anche lo studio di un ulteriore parametro, il fuso meiotico. Questo grazie all'utilizzo di un nuovo microscopio a luce polarizzata e ad orientamento indipendente, il Poloscopio (CRI, USA), accoppiato ad un software di processamento digitale dell'immagine che permette di visualizzare strutture macromolecolari ordinate, come il fuso meiotico o i diversi strati della zona pellucida, sulla base della loro rifrangenza.

Recenti lavori (Shen et al. 2006; Rama et al. 2007) dimostrano come elevati valori di ritardo del fuso meiotico siano positivamente correlati con un buon sviluppo embrionale e un'alta frequenza di impianto.

E' da questi risultati che nasce l'importanza del Poloscopio come ulteriore metodo di screening nella selezione ovocitaria, soprattutto in Italia dove in seguito alla nuova legislazione, l'attenzione si è inevitabilmente spostata sull'ovocita e non più sull'embrione.

Il laboratorio presso l'U.O. di Fisiopatologia della Riproduzione dell'Ospedale "Cervesi" di Cattolica è uno dei pochi in Italia ad essere dotato di questo particolare microscopio a luce polarizzata e, sulla base dei promettenti risultati della letteratura,

lo scopo iniziale della mia tesi era di definire alcuni parametri oggettivi che potessero essere d'aiuto nella selezione degli ovociti di migliore qualità per ogni paziente, in modo da assicurare ad essa una maggiore probabilità di gravidanza.

Cosa ha portato a modificare il titolo della tesi?

Il fatto che i dati raccolti durante il mio periodo di internato siano quasi totalmente in disaccordo con quelli presenti in letteratura.

Questo ed ulteriori osservazioni ci hanno portato ad analizzare l'argomento da un altro punto di vista, tentando per prima cosa di dare una spiegazione ai risultati ottenuti.

ANATOMIA DELL'APPARATO RIPRODUTTIVO FEMMINILE

L'apparato genitale femminile è costituito dalle gonadi femminili, dalle vie genitali e dai genitali esterni. E' localizzato profondamente nella piccola pelvi e svolge una duplice funzione: gametogenica ed endocrina. Inoltre l'apparato genitale femminile rende possibile l'incontro delle cellule germinali femminili, ovociti, con quelle maschili e garantisce il microambiente idoneo allo sviluppo della cellula uovo fecondata rendendone possibile, una volta completato lo sviluppo, l'espulsione all'esterno mediante il parto. L'apparato genitale femminile va incontro a notevoli modificazioni strutturali e funzionali dall'infanzia alla maturità sessuale alla menopausa, per azione degli ormoni sessuali. Tali ormoni inducono anche variazioni strutturali e funzionali cicliche, a carico dei vari organi che costituiscono l'apparato riproduttivo stesso.

Schematicamente, l'apparato genitale femminile può essere suddiviso in: gonadi (ovaie), vie genitali (tube uterine, utero, vagina), genitali esterni (Fig.1).

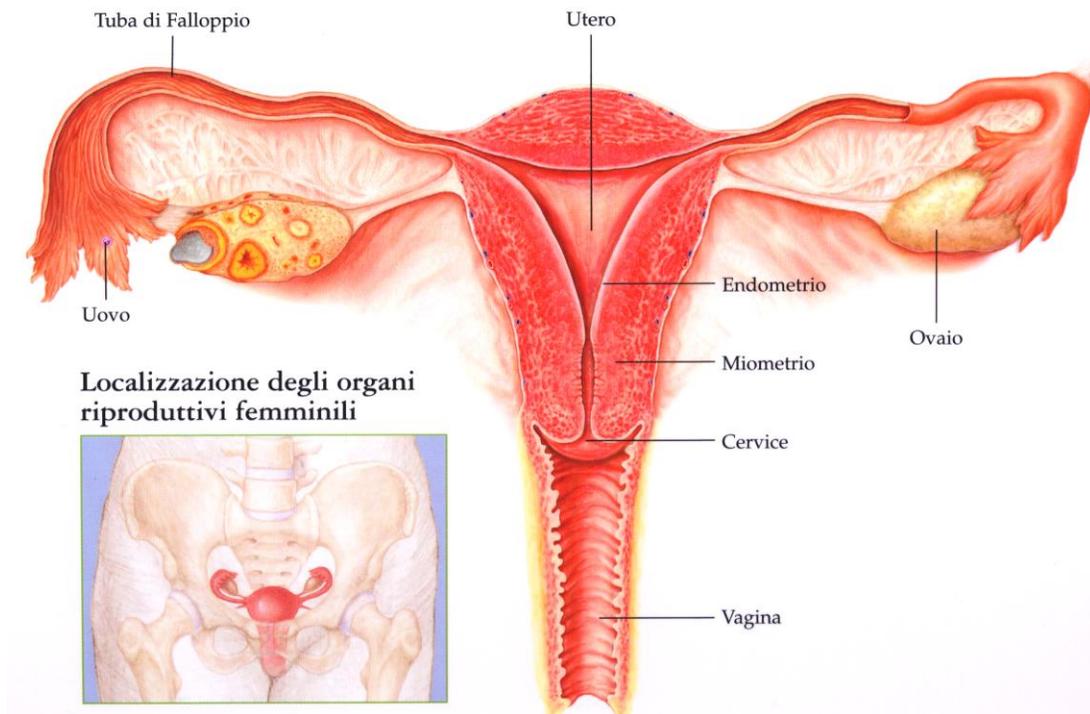


Fig. 1 Apparato riproduttivo femminile.

Ovaie

Le ovaie rappresentano le gonadi femminili e sono responsabili della produzione delle cellule germinali aploidi, gli ovociti, e degli ormoni sessuali femminili, principalmente estrogeni e progesterone, che preparano la mucosa dell'utero all'impianto embrionale e mantengono la gravidanza, se si è verificata. Le ovaie sono organi pari di forma ovale situati lateralmente alla cavità pelvica, sono organi pieni la cui superficie è rivestita da un epitelio cubico semplice. L'epitelio superficiale e lo strato connettivale sottostante fanno parte della porzione più esterna del parenchima ovarico, la corticale, che contiene gli organuli ovarici e un ricco stroma di sostegno.

Profondamente alla zona corticale si trova la midollare. La zona midollare si superficializza a livello dell'ilo ovarico, contiene numerosi vasi sanguigni e linfatici, nervi e un ricco stroma connettivale.

Tube uterine

Le tube uterine, o salpingi o trombe di Falloppio, sono organi pari cavi, localizzati nella piccola pelvi, tra le ovaie, poste lateralmente e l'utero situato centralmente. Sono gli organi in cui avviene la fecondazione e la prima segmentazione dell'embrione: quindi danno passaggio sia agli spermatozoi, che sono risaliti attraverso le vie genitali per raggiungere l'ovocita, sia alla cellula uovo fecondata, la quale deve raggiungere la cavità uterina per impiantarsi. Ogni tuba, di lunghezza variabile da 10 a 14 cm, decorre dal polo superiore dell'ovaio all'angolo superiore dell'utero, accolta nel margine superiore del legamento largo; vi si possono distinguere quattro porzioni: infundibolo, ampolla, istmo e porzione intramurale che differiscono tra loro per calibro e direzione.

L'infundibolo è la porzione più vicina all'ovaio, ha la forma di un imbuto a parete sfrangiata, in quanto il suo orifizio è circondato da una serie di fimbrie. Una di queste, la fimbria ovarica, collega l'infundibolo con l'ovaio. L'epitelio che riveste questo tratto della salpinge presenta cellule ciliate che hanno funzione di raccoglimento del gamete ovulato e di successivo sospingimento di questo verso l'interno della tuba. L'ampolla della tuba è il tratto più lungo e tortuoso. Inizialmente forma un'ansa che sormonta il polo superiore dell'ovaio, quindi piega in basso decorrendo quasi verticalmente sulla faccia mediale di quest'ultimo. Infine assume un decorso orizzontale descrivendo un angolo aperto medialmente e percorre il margine superiore del legamento largo in direzione dell'utero. L'istmo rappresenta la porzione

più ristretta della tuba uterina, raggiunge il margine laterale dell'utero al limite tra corpo e fondo dove è in continuità con la porzione intramurale che attraversa la parete uterina, per aprirsi tramite l'ostio uterino, nella cavità dell'utero. Il tratto intermedio della tuba presenta uno spessore muscolare esterno crescente man mano che ci si avvicina all'utero. Il trasporto dell'ovocita (verso l'utero) e degli spermatozoi (in direzione opposta) avviene per l'azione sinergica delle contrazioni peristaltiche muscolari e delle ciglia delle cellule epiteliali.

La salpinge termina con l'istmo, un breve segmento che continua con la porzione che si inserisce nello spessore della parete uterina.

Utero

L'utero è un organo muscolare cavo a forma conica, impari e mediano, posto al centro della piccola pelvi, al di dietro della vescica e al davanti del retto. E' lungo circa 7 cm e con un diametro massimo di 5 cm in condizioni fisiologiche di non gravidanza e per questo è definita come cavità virtuale.

Riceve lo sbocco delle tube uterine ed è connesso all'esterno tramite il canale vaginale. Rappresenta l'organo della gestazione, permettendo l'annidamento della blastocisti e il successivo sviluppo embriofetale, fino al parto. Nel corso della vita fertile della donna, la sua mucosa va incontro a modificazioni cicliche, sotto il controllo degli ormoni sessuali prodotti dall'ovaio (ciclo mestruale).

Nell'utero si possono distinguere le cavità del corpo e quella corrispondente al collo, detta canale cervicale. In corrispondenza dell'istmo, l'orifizio uterino interno, segna il limite tra le due cavità. Il canale cervicale sbocca in vagina per mezzo dell'orifizio uterino esterno (Fig.2).

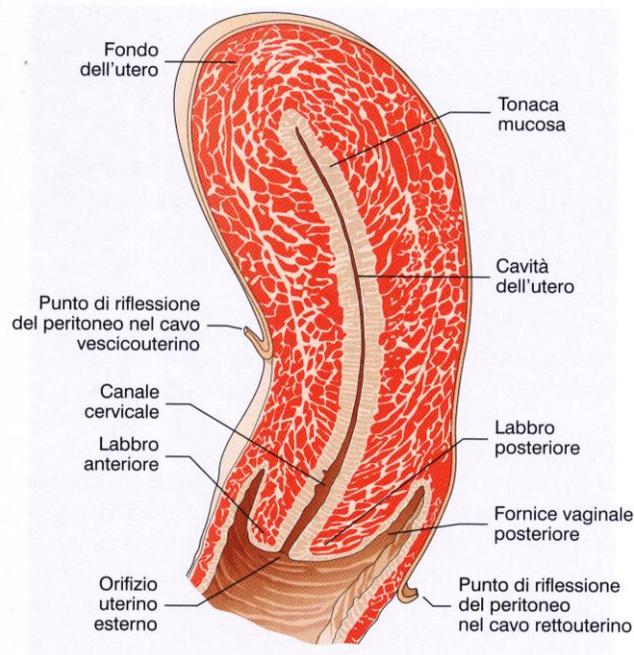


Fig. 2 Sezione sagittale dell'utero. Le pareti anteriore e posteriore dell'organo risultano molto ravvicinate quindi sul piano anteroposteriore il lume appare virtuale.

La parete uterina che ha uno spessore medio di 1-2 cm, è costituita, dall'interno verso l'esterno, dalla tonaca mucosa o endometrio, dalla tonaca muscolare o miometrio, e dalla tonaca sierosa detta perimetrio.

L'endometrio è lo strato più interno costituito da epitelio cilindrico monostratificato e lamina propria; rappresenta il 10% dello spessore, contiene abbondanti ghiandole che si portano in profondità nella lamina propria e insieme ai vasi, provvedono al fabbisogno fetale. L'endometrio del corpo uterino varia ciclicamente sotto l'azione degli ormoni secreti dall'ovaio (ciclo uterino) predisponendolo all'impianto dell'embrione. Il miometrio è lo strato intermedio costituito dagli strati muscolari longitudinale, circolare e obliquo; rappresenta il 90% dello spessore. Le sue contrazioni, stimulate dall'ossitocina ipofisaria, danno inizio al travaglio del parto e spingono il feto a termine in vagina.

FISIOLOGIA DELL'APPARATO RIPRODUTTIVO FEMMINILE

Gamete femminile

La cellula uovo ha in tutte le specie un volume maggiore di quello delle cellule somatiche: nell'uomo le sue dimensioni sono di circa 80-100 μm .

Il maggior volume è dovuto all'accumulo di deutoplasma, cioè di materiale di riserva che costituirà la prima fonte di energia per lo sviluppo del nuovo organismo.

Il nucleo della cellula uovo è ben visibile a livello di profase della prima divisione meiotica. A questo stadio il nucleo è di grosse dimensioni e di aspetto vescicoloso (vescicola germinale) con un evidente nucleolo ed a volte piccoli nucleoli accessori.

Nel citoplasma si differenzia uno strato corticale particolarmente viscoso che contiene i granuli corticali, piccole vescicole di 0.8-2 μm contenenti glicosaminoglicani ed enzimi protagonisti della reazione zonale e del blocco della polispermia.

Nell'ovocita maturo (metafase II) sono accumulate grandi quote di ribosomi liberi, benché i poliribosomi siano scarsi.

Questo indica che lo scopo dell'accumulo è da ricercare nella costituzione dell'apparato strutturale necessario alle prime sintesi proteiche del futuro embrione, piuttosto che a necessità immediate.

Inoltre nel citoplasma degli ovociti si ammassano granuli di glicogeno e gocce lipidiche sparse che probabilmente servono a fornire energia e substrati per la sintesi di nuove membrane dopo la fertilizzazione.

L'ovocita è provvisto di un oolemma cui è apposto uno strato esterno detto zona pellucida costituito da materiale glicoproteico secreto dall'ovocita e dalle cellule del follicolo ovarico.

Sebbene poco conosciuta per diverso tempo, alla zona pellucida oggi vengono attribuite molte importanti funzioni nel delicato processo della fecondazione e nei primi stadi dello sviluppo dell'embrione.

Tra queste sono da annoverare la presentazione di recettori glicoproteici specie-specifici per gli spermatozoi (ZP1, ZP2, ZP3), l'induzione della reazione acrosomiale, il blocco della polispermia, la protezione dell'embrione.

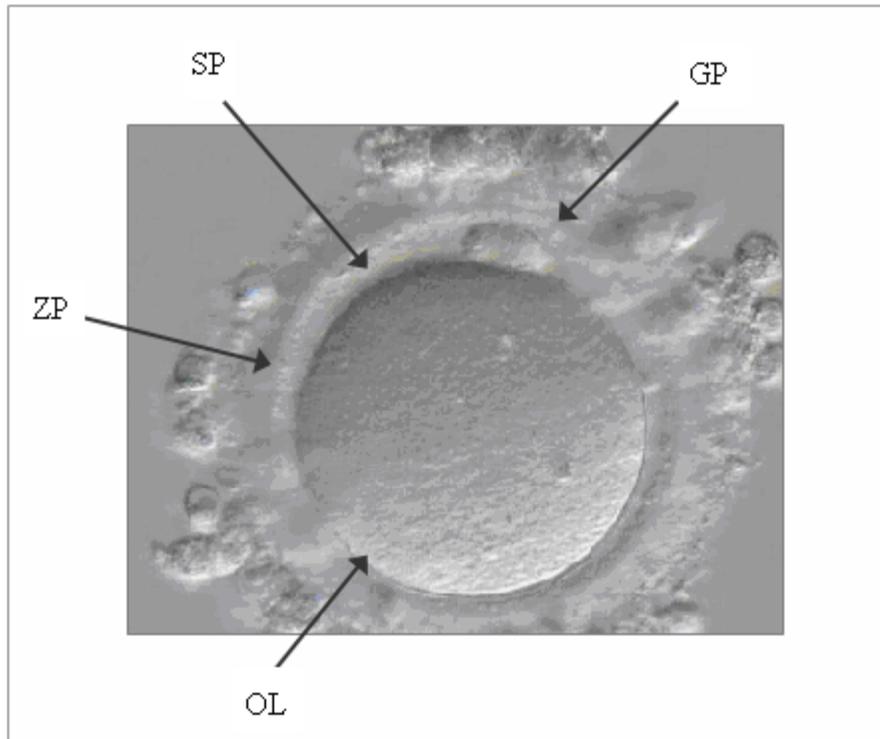


Fig. 3 Ovocita denudato dove vengono mostrate le componenti principali visibili al microscopio ottico. GP = globulo polare; SP = spazio perivitellino; ZP = zona pellucida; OL = oolemma.

La superficie dell'ovocita si solleva in microvilli che penetrano nella zona pellucida interdigandosi con prolungamenti delle cellule follicolari adiacenti.

I contatti morfofunzionali tra queste cellule vengono stabiliti da gap junctions, che consentono lo stabilirsi di cooperatività metabolica tra le cellule.

Giunzioni dello stesso tipo collegano anche le cellule follicolari tra di loro. Esternamente alla zona pellucida nella specie umana come in tutti i mammiferi sono visibili alcune cellule follicolari unite tra loro e metabolicamente accoppiate a costituire la corona radiata, le quali accompagneranno l'ovocita lungo il primo tratto della tuba. Attorno all'ovocita, alle cellule del cumulo e della corona radiata esiste una matrice extracellulare assai complessa costituita da ammassi granulari proteici e da un reticolo di acido ialuronico. Anch' essa ha sicuramente un ruolo importante al momento della fecondazione, poiché lo spermatozoo deve rimuovere questo rivestimento per giungere abbastanza vicino all'ovocita.

Meiosi

La meiosi è il fenomeno naturale che permette alle cellule germinali di dimezzare il proprio corredo cromosomico (riduzione cellulare) e di essere così pronte per essere fecondate. Consiste in due divisioni cellulari consecutive accompagnate da una sola duplicazione dei cromosomi. Al termine della meiosi ogni cellula figlia ha un numero aploide (n , 23) di cromosomi.

Sembra che la meiosi venga indotta da una particolare sostanza, prodotta dalle cellule della corticale ovarica, detta MIF (Meiosis Initiation Factor). Quando un ovocita maturo, con un numero aploide di cromosomi, si unisce ad uno spermatozoo anch'esso aploide, si forma in primo luogo un ootide, cioè una cellula con visibili i due pronuclei, uno maschile e uno femminile, e successivamente uno zigote diploide ($2n$, 46 cromosomi).

La meiosi differisce dalla mitosi per la riduzione del corredo cromosomico da diploide ad aploide. Inoltre essa crea nuove combinazioni di geni grazie al riarrangiamento dei cromosomi definito "crossing over" durante il pachitene della prima divisione meiotica, che consiste nell'interscambio di segmenti cromatidici tra cromosomi omologhi.

Nella meiosi distinguiamo due stadi: meiosi I (MI) e meiosi II (MII) (Fig.4).

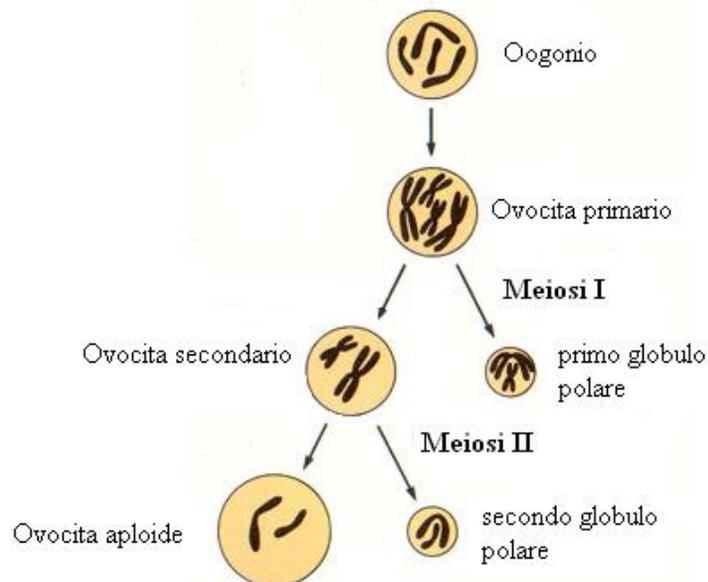


Fig. 4 Visione schematica delle fasi che portano alla formazione di un ovocita aploide.

La prima divisione meiotica interessa gli ovociti primari che sono cellule diploidi ed è caratterizzata dalla segregazione degli omologhi di ogni coppia in due cellule figlie che prendono il nome di ovocita secondario e primo globulo polare. Tutto ciò è reso possibile perchè i centromeri non si scindono e i due cromatidi fratelli vengono segregati insieme nelle due cellule figlie. Durante la seconda divisione meiotica, i cromatidi si separano per divisione del centromero, segregandosi nelle due cellule figlie risultanti, dette cellula uovo e secondo globulo polare le quali ricevono un solo cromatide di ciascun cromosoma.

A differenza della meiosi dei gameti maschili, dalla meiosi femminile si ottiene un solo ovocita vitale con una grossa massa di ooplasma e due globuli polari: la divisione cellulare è asimmetrica e il primo globulo polare non partecipa alla seconda divisione.

Entrambi gli stadi della meiosi si dividono in profase, metafase, anafase e telofase.

La profase I è complessa ed è divisa in cinque sottostadi: leptotene, zigotene, pachitene, diplotene e diacinesi.

Nella profase della prima divisione meiotica, nel periodo di diplotene, il processo meiotico, subisce, nel feto femminile, un arresto di durata molto lunga. Il passaggio al periodo successivo avviene dopo molti anni: solo dopo la pubertà, alcuni elementi, riprendono progressivamente e ciclicamente l'evoluzione che conclude la prima parte della meiosi. La seconda parte viene completata ad ogni singola ovulazione conferendo finalmente all'ovocita la possibilità di essere fecondato. In risposta al picco preovulatorio delle gonadotropine, l'attività nucleare riprende: l'ovocita completa la prima divisione meiotica ed elimina il primo globulo polare. L'ovocita, ora chiamato ovocita secondario, inizia quindi la seconda divisione meiotica ma nuovamente si arresta in metafase II. Solo dopo l'ovulazione e la successiva fecondazione, l'ovocita completerà anche la seconda divisione meiotica con l'estrusione del secondo globulo polare.

Quindi un ovocita in metafase I si differenzia da un ovocita in metafase II perché il primo non ha estruso il globulo polare, il secondo sì.

L'ovocita maturo ha un diametro di 80-100 μm , i globuli polari di 10 μm .

Fasi della prima divisione meiotica (MI)

La profase I è complessa ed è divisa in cinque sottostadi: leptotene, zigotene, pachitene, diplotene e diacinesi.

Nel Leptotene: i cromosomi appaiono per la prima volta come distinti in esili filamenti, l'appaiamento longitudinale dei due omologhi di ogni coppia di cromosomi avviene nello Zigotene.

Nel Pachitene i cromosomi si spiralizzano, diventano più corti e più spessi. Appaiono evidenti le coppie di omologhi appaiate e la duplicazione di ogni omologo in due cromatidi fratelli avvenuta in interfase (il corredo cromosomico quindi è $4n$, cioè tetraploide).

In questo stadio si verifica il crossing-over di segmenti tra i due cromosomi omologhi, dopo questo, nel Diplotene, i cromosomi omologhi appaiati longitudinalmente cominciano a respingersi e a separarsi rimanendo uniti nelle zone in cui era avvenuto il crossing-over.

La cromatina si decondensa parzialmente ed in questo stadio ha inizio un'intensa attività trascrizionale, necessaria per accumulare nell'ovocita le scorte di RNA ribosomiale e messaggero essenziali per le prime fasi dello sviluppo embrionale.

L'ovocita in questo stadio è caratterizzato da un nucleo di forma caratteristica detta vescicola germinale.

Durante la Diacinesi continua l'accorciamento dei cromosomi e la separazione dei cromosomi omologhi. Il nucleolo si dissolve e l'involucro nucleare sparisce.

Nella Metafase I si è formato completamente il fuso meiotico ed i cromosomi omologhi si allineano sul piano equatoriale. Negli ovociti il fuso è eccentrico, i cromosomi sono allineati in modo casuale e vanno indipendentemente verso l'ovocita o verso il primo globulo polare. Al microscopio non è più visibile la vescicola germinale.

Durante l'Anafase I i cromosomi omologhi si separano completamente, spostandosi verso i due poli cellulari.

Nella Telofase I si ha la riformazione dell'involucro nucleare e il ritorno dei cromosomi alle condizioni di interfase. Avviene la divisione cellulare con asimmetrica distribuzione del materiale citoplasmatico all'ovocita primario e globulo polare. L'ovocita a questo punto della divisione meiotica possiede, come il primo globulo polare, un assetto diploide $2n$.

Fasi della seconda divisione meiotica (MII)

La seconda divisione meiotica non è preceduta da sintesi di DNA e da duplicazione dei cromosomi, per cui l'interfase non è una vera interfase. Ha una durata brevissima (poche ore).

Nella Metafase II si forma il fuso e scompare l'involucro nucleare. Comincia l'allineamento dei 23 cromosomi a livello equatoriale.

Successivamente, durante l'Anafase II, i cromosomi costituiti da due cromatidi fratelli si dispongono sul piano equatoriale, il centromero di ogni cromosoma si divide e i due centromeri migrano ai poli opposti della cellula.

Nella Telofase II si riforma l'involucro nucleare e i cromosomi si despiralizzano parzialmente. Il citoplasma si divide nuovamente in maniera asimmetrica, con formazione del vero ovocita e del secondo globulo polare che possiedono un corredo cromosomico aploide.

Oogenesi e ciclo ovarico

L'oogenesi inizia nelle prime fasi di vita embrionale, nelle prime 4-6 settimane le cellule germinali primordiali migrano dal sacco vitellino alla cresta genitale, dove sono avvolte dalle cellule dei cordoni sessuali corticali e si differenziano in ovogoni, che si moltiplicano per mitosi.

Dal terzo-quarto mese di vita fetale gli ovogoni replicano il patrimonio genetico e iniziano il processo di meiosi. Gli ovociti primari diventano quiescenti nella profase I (diplotene); le cellule dei cordoni sessuali rivestono gli ovociti con un epitelio pavimentoso monostratificato, diventando cellule della granulosa. Questa struttura è definita nel suo complesso follicolo primordiale.

Nel corso del quarto e quinto mese di sviluppo fetale, il numero di follicoli primordiali aumenta e raggiunge il suo massimo (circa 7 milioni) nel sesto mese di vita fetale. Se attorno agli ovociti non si sviluppa l'epitelio follicolare, essi vanno incontro ad un processo degenerativo chiamato atresia. Si conta infatti che al momento della nascita i follicoli primordiali siano circa 2 milioni ma che nel periodo della maturazione sessuale il loro numero sia già calato a 400.000.

I follicoli primordiali e gli ovociti primari rimangono in questa fase di quiescenza fino alla pubertà.

Il ciclo ovarico è essenzialmente costituito da tre fasi: una fase preovulatoria o follicolare, una fase ovulatoria e una fase postovulatoria o luteinica (Fig.5).

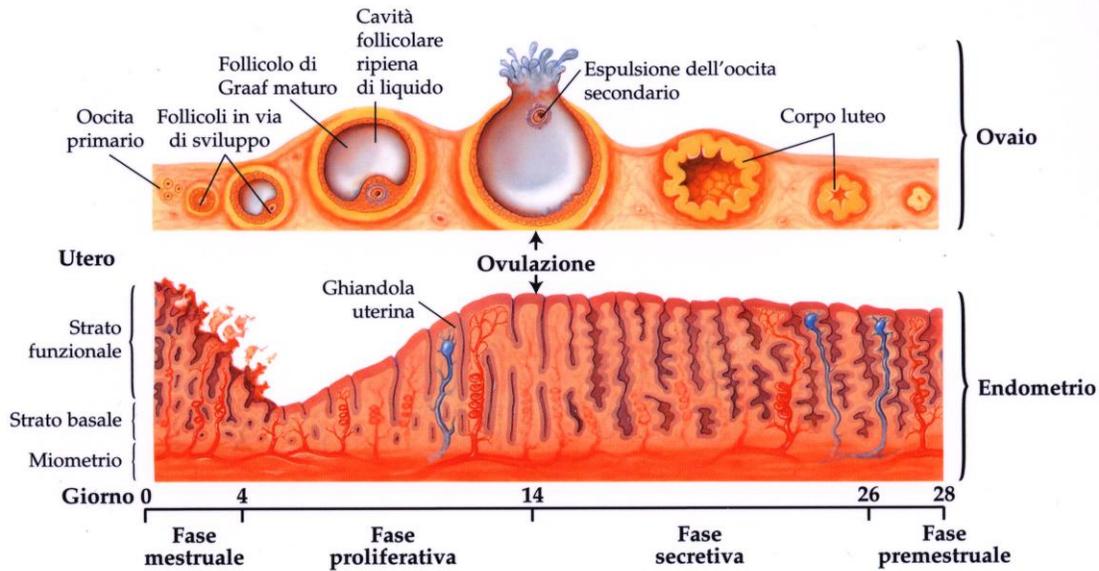


Fig. 5 Ciclo ovarico e corrispondenti fasi del ciclo mestruale.

La fase follicolare consiste nella maturazione di un follicolo primordiale in un follicolo maturo. Alla pubertà la secrezione ciclica, da parte dell'adenoipofisi, di ormone follicolo-stimolante (follicle-stimulating hormone, FSH) provoca il passaggio di un piccolo numero di follicoli primordiali (dieci-dodici) dalla fase quiescente a quella evolutiva, con conseguente aumento di volume dell'ovocita associato ad un ingrandimento delle cellule dell'epitelio follicolare, dette anche cellule della granulosa, che si fanno cubiche o cilindriche; in questa fase si parla di follicolo primario. L'ovocita mostra un plasmalemma ricco di brevi microvilli e inizia a produrre un rivestimento glicoproteico, la zona pellucida, che si inserisce tra la cellula uovo e l'epitelio follicolare. La zona pellucida viene attraversata da sottili prolungamenti delle cellule della granulosa che prendono contatto tramite gap junction con il plasmalemma della cellula uovo e hanno la funzione di trasportare sostanze utili per l'accrescimento dell'ovocita. Lo stadio maturativo successivo corrisponde al follicolo secondario: questa fase è caratterizzata da una ulteriore proliferazione delle cellule della granulosa e dall'ispessimento della zona pellucida. Il follicolo secondario tende a spostarsi nella parte più profonda della corticale mentre le cellule che lo circondano si organizzano a costituire una sorta di capsula, la teca del follicolo, dove successivamente sarà possibile distinguere due strati, la teca interna e la teca esterna. Le cellule della granulosa iniziano a produrre liquido follicolare, ricco di acido ialuronico, steroidi, fattori di crescita e gonadotropine, formando l'antro

follicolare che via via aumenta di dimensioni. Lo sviluppo dell'antro spinge l'ovocita verso la periferia della vescicola che si sta ingrandendo. L'insieme delle cellule della granulosa e l'ovocita prende il nome di cumulo ooforo mentre lo strato di epitelio follicolare immediatamente circostante la cellula uovo viene denominato corona radiata. Il follicolo maturo, o vescicola di Graaf, raggiunge dimensioni considerevoli (12-20 mm) e sporge sulla superficie dell'ovaio come una piccola formazione cistica. La fase preovulatoria del ciclo ovarico ha una durata media di quattordici giorni e inizia con la maturazione di un numero variabile di follicoli (sei-dodici). Intorno al sesto giorno un follicolo predomina e gli altri vanno incontro a fenomeni involutivi.

Intorno al quattordicesimo giorno del ciclo ovarico, un picco nella secrezione da parte dell'adenoipofisi di ormone LH provoca l'ovulazione. A livello della zona di contatto tra la parete follicolare e la superficie ovarica un'intensa attività proteolitica da parte dei fibroblasti della teca esterna provoca una parziale demolizione della matrice connettivale con conseguente rottura del follicolo e fuoriuscita dell'ovocita secondario unito alla corona radiata tramite la zona pellucida e parte del cumulo ooforo. Il complesso oocita-corona radiata viene condotto verso l'orifizio dell'infundibolo tubarico, grazie a una sorta di movimento attivo dell'estremità della fimbria che si ripiega sulla superficie ovarica prevenendo la caduta della cellula uovo nella cavità peritoneale.

Nella fase postovulatoria il follicolo va incontro a una serie di modificazioni strutturali e funzionali che portano alla formazione del corpo luteo. Le modificazioni principali riguardano le cellule della granulosa e della teca interna: le cellule della granulosa aumentano di volume e acquisiscono gli organuli tipici degli elementi steroidogenici (reticolo endoplasmatico liscio, mitocondri...) e si trasformano in cellule luteiniche di origine granulosa che iniziano a secernere progesterone in risposta all'ormone LH. Le cellule della teca interna vanno ugualmente incontro ad un aumento di volume e si trasformano in cellule luteiniche di origine tecale e secernono progesterone e androstenedione, che sarà trasformato in estradiolo dalle cellule di origine granulosa, in risposta all'ormone LH. Se non si verifica la fecondazione, il corpo luteo va incontro ad un processo di regressione che inizia circa dieci giorni dopo l'ovulazione con eventi apoptotici, in questo modo le cellule endocrine del corpo luteo scompaiono e i livelli ematici di estrogeni e progesterone si riducono. Questo comporta, oltre alle marcate modificazioni a carico dell'endometrio, anche il riavvio del ciclo ovarico. L'esito finale della luteolisi è la formazione di una piccola massa sferoidale fibrosa acellulare detta corpo albicante. Se invece avviene la fecondazione, il corpo luteo diventa gravidico perché continua a funzionare

producendo grandi quantità di progesterone ed estrogeni sotto l'influenza della gonadotropina corionica umana (hCG) prodotta dal trofoblasto dell'embrione impiantato. Dopo sei-otto settimane la funzione del corpo gravidico è sostituita dalla placenta.

Ciclo mestruale

Gli ormoni sessuali secreti ciclicamente dall'ovaio inducono a livello dell'endometrio una serie di modificazioni che vanno sotto il nome di ciclo mestruale. Ciascun ciclo mestruale dura di norma circa ventotto giorni, anche se c'è molta variabilità.

Un ciclo è costituito da tre fasi consecutive: desquamativa, proliferativa e secretiva, le prime due corrispondono alla fase preovulatoria del ciclo ovarico, la terza alla fase postovulatoria. La fase desquamativa corrisponde alla mestruazione, cioè l'espulsione dello strato funzionale dell'endometrio accompagnata da emorragia, e ha una durata di quattro-cinque giorni. Contemporaneamente a livello ovarico inizia un nuovo ciclo di maturazione follicolare. La fase proliferativa ha una durata di circa nove giorni. All'inizio di questa fase, dell'endometrio rimangono solo circa 0.5-1 mm di strato basale, l'aumento di spessore dipende dall'azione degli estrogeni prodotti dall'ovaio. Cellule dell'epitelio ghiandolare migrano verso la superficie, le ghiandole si fanno lunghe e sottili e anche i vasi rigenerano e si dispongono parallelamente alle ghiandole. In seguito, in piena fase proliferativa, le ghiandole si fanno più tortuose, lo stroma più lasso mentre i vasi della porzione più superficiale dell'endometrio cominciano ad assumere un decorso a spirale. Dopo l'ovulazione a livello dell'endometrio inizia la fase secretiva che ha una durata di circa tredici-quattordici giorni, caratterizzata da una serie di modificazioni che rendono la mucosa idonea all'annidamento del prodotto del concepimento. In questa fase le cellule epiteliali di rivestimento e principalmente quelle ghiandolari accumulano granuli di glicogeno, i lumi ghiandolari appaiono ripieni di secreto ricco di glicogeno e di glicoproteine. Durante la fase secretiva il solo strato funzionale dell'endometrio può raggiungere uno spessore di 8 mm. Nei giorni finali del ciclo l'attività secretoria delle ghiandole diminuisce, le arterie spirali vanno incontro a contrazioni ritmiche che riducono il flusso ematico allo strato funzionale. Questo va quindi incontro ad ischemia, riducendo il suo spessore a 3-4 mm, con fenomeni necrotici dello stroma e delle ghiandole. Con il successivo rilasciamento delle arterie spirali, affluisce di nuovo sangue allo strato funzionale ischemico, la parete dei piccoli vasi e dei capillari si lacera, e si ha quindi un sanguinamento e desquamazione dello strato funzionale.

ENDOCRINOLOGIA RIPRODUTTIVA FEMMINILE

Il controllo neuroendocrino della riproduzione nella donna dipende da una continua interazione tra ipotalamo, ipofisi e ovaie (Fig.6).

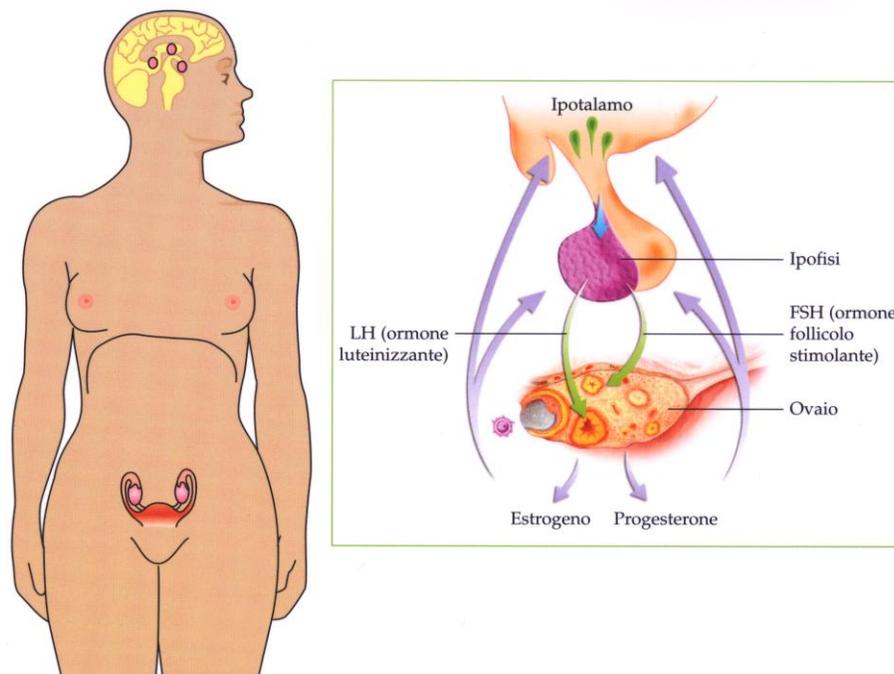


Fig. 6 Asse ipotalamo, ipofisi e ovaio.

Nella femmina, a differenza del maschio, i processi riproduttivi sono ciclici e non si svolgono in forma continuativa.

Nella femmina l'ipotalamo secerne il releasing hormone per il rilascio delle gonadotropine, o GnRH, che è trasportato sino all'ipofisi anteriore dove stimola il rilascio di LH e FSH. Questi stimolano lo sviluppo delle cellule germinali e la secrezione ormonale delle ovaie.

Gli effetti delle gonadotropine sulle ovaie variano in funzione delle diverse fasi del ciclo ovarico.

Controllo neuroendocrino della fase follicolare

Una volta al mese, appena prima che cessino le mestruazioni, inizia lo sviluppo accrescitivo dei follicoli nell'ovaio. L'accrescimento follicolare è stimolato dall'ormone ipofisario FSH. L'FSH stimola sia l'ipertrofia (aumento delle dimensioni

cellulari) che l'iperplasia (aumento del numero di cellule) delle cellule della granulosa che circondano il follicolo primario.

In risposta all'FSH, le cellule della granulosa sintetizzano estrogeni da precursori androgeni. La secrezione di estrogeni dalle cellule della granulosa determina l'aumento del livello degli estrogeni circolanti. Gli estrogeni stimolano ulteriormente la secrezione di GnRH dall'ipotalamo e di LH ed FSH dall'ipofisi.

Gli estrogeni, secreti dalle cellule della granulosa follicolare, agiscono localmente, con azione autocrina sulle cellule della granulosa stesse su cui aumentano i recettori specifici per gli estrogeni e per l'FSH. Man a mano che il numero dei recettori per gli estrogeni aumenta, una maggiore quantità di estrogeni è captata all'interno del follicolo. L'incremento del numero di recettori per l'FSH avvenuto nelle cellule della granulosa serve a potenziare gli effetti trofici dell'FSH sulle cellule della granulosa. L'accrescimento del follicolo è accompagnato dall'aumento della secrezione di estrogeni i quali, a loro volta, continuano a potenziare l'azione dell'FSH sul follicolo. L'accrescimento e lo sviluppo follicolare nell'ovaia può dunque essere visto come un processo che si autoalimenta e che presuppone una complessa interazione tra l'ipofisi e l'ovaia. Questo processo si concretizza in una crescita graduale e continua del follicolo ed in un altrettanto graduale aumento della secrezione estrogenica. L'FSH secreto dall'ipofisi e gli estrogeni secreti dal follicolo inducono, inoltre, l'aumento dei recettori per l'LH presenti sulla superficie delle cellule della granulosa. L'aumento del numero di questi recettori gioca un ruolo molto importante nei processi che portano alla formazione del corpo luteo.

Nel corso della fase follicolare, si assiste ad un'altra interazione tra ipofisi e ovaie. Gli aumentati livelli di estrogeni, secreti dalle cellule della granulosa, stimolano l'ipofisi a secernere una maggiore quantità di LH. L'aumento della concentrazione di LH nel sangue stimola le cellule della teca follicolare a sintetizzare due androgeni: testosterone e androstenedione. Questi androgeni esercitano un'azione paracrina sulle cellule limitrofe del follicolo. Gli androgeni si diffondono all'interno delle cellule della granulosa dove fungono da precursori per la sintesi degli estrogeni.

I livelli aumentati di LH stimolano le cellule della granulosa a secernere, oltre agli androgeni, il progesterone che entra nel torrente circolatorio e inizia ad aumentare la sua concentrazione ematica. Inoltre, una certa quota di progesterone, proveniente dalla granulosa, retrodiffonde nelle cellule della teca e viene utilizzata come substrato per la sintesi di androgeni da parte delle cellule tecali.

Di 6–20 follicoli reclutati per l'ovulazione, uno solo, il dominante, raggiunge lo stadio finale di maturazione mentre gli altri degenerano. Il processo di atresia

follicolare rimane oscuro ma potrebbe derivare da un numero insufficiente di recettori per l'FSH posti sulle cellule di alcuni follicoli o dall'incapacità da parte delle cellule della granulosa di produrre quantità adeguate di estrogeni dai precursori androgeni.

Controllo neuroendocrino dell'ovulazione

Nel corso della fase follicolare del ciclo ovarico, l'aumento della quantità di estrogeni secreti dalle ovaie stimola il rilascio di LH ed FSH dall'ipofisi anteriore. Ciò assicura un accrescimento continuo del follicolo per circa 10 giorni. Al quattordicesimo giorno, immediatamente prima dell'ovulazione, i livelli ematici di LH ed FSH raggiungono il valore di picco all'interno del ciclo ovarico (85 mIU/ml per LH e 20 mIU/ml per FSH). Questi valori sono definiti picchi preovulatori. Tra le modifiche indotte dal picco dell'LH, alcune portano alla trasformazione della struttura follicolare in modo da causare l'ovulazione. Le modificazioni indotte dall'LH includono l'aumento della produzione di liquido antrale, la compressione del follicolo contro le pareti dell'ovaia e la degenerazione enzimatica della parete ovarica con conseguente rilascio del fluido antrale e dell'ovocita nella cavità addominale. L'ovulazione segna il termine della fase follicolare del ciclo ovarico.

Controllo neuroendocrino della fase luteinica

Immediatamente dopo il rilascio dell'ovocita dal follicolo, avvenuto nel quattordicesimo giorno del ciclo ovarico, le rimanenti cellule della granulosa aumentano di dimensioni e subiscono il processo di luteinizzazione, che consiste in svariate modificazioni di ordine biochimico sino a trasformarsi in corpo luteo. La differenziazione e la crescita del corpo luteo sono stimulate dall'LH secreto dall'ipofisi anteriore. Il ruolo dell'FSH nella fase luteinica è invece sconosciuto.

Nel corso della fase luteinica, il corpo luteo secreta una grande quantità di progesterone e quantità inferiori di estrogeni, aumentando i rispettivi livelli ematici. Gli estrogeni secreti dal corpo luteo sono strutturalmente uguali a quelli secreti dal follicolo nella fase follicolare.

Però, mentre gli estrogeni secreti durante la fase follicolare pre-ovulatoria stimolano il rilascio di GnRH, FSH e LH, gli estrogeni e il progesterone secreti durante la fase luteinica inibiscono sia la secrezione ipotalamica di GnRH che la secrezione ipofisaria di FSH e LH e le rispettive concentrazioni ematiche diminuiscono.

Man a mano che i livelli di LH e FSH diminuiscono nel corso della fase luteinica, lo stimolo per la crescita follicolare viene meno e non si assiste alla crescita di nuovi

follicoli. Il corpo luteo aumenta di dimensioni per circa 7–8 giorni dopo l'ovulazione, dopodichè inizia a degenerare a causa dei livelli decrescenti di LH.

Nel corso della degenerazione il corpo luteo secerne quantità sempre minori di progesterone ed estrogeni, con conseguente abbassamento dei rispettivi livelli ematici. L'inibizione del rilascio di GnRH, LH e FSH che era assicurata dal progesterone e dagli estrogeni del corpo luteo non ha più effetto e i rispettivi livelli ematici cominciano ad aumentare dando inizio ad una nuova fase follicolare.

Controllo neuroendocrino della fase mestruale

Nel corso del ciclo ovarico l'endometrio subisce notevoli modificazioni, indotte da estrogeni e progesterone, sia nella struttura che nelle capacità secretorie (Fig.7),

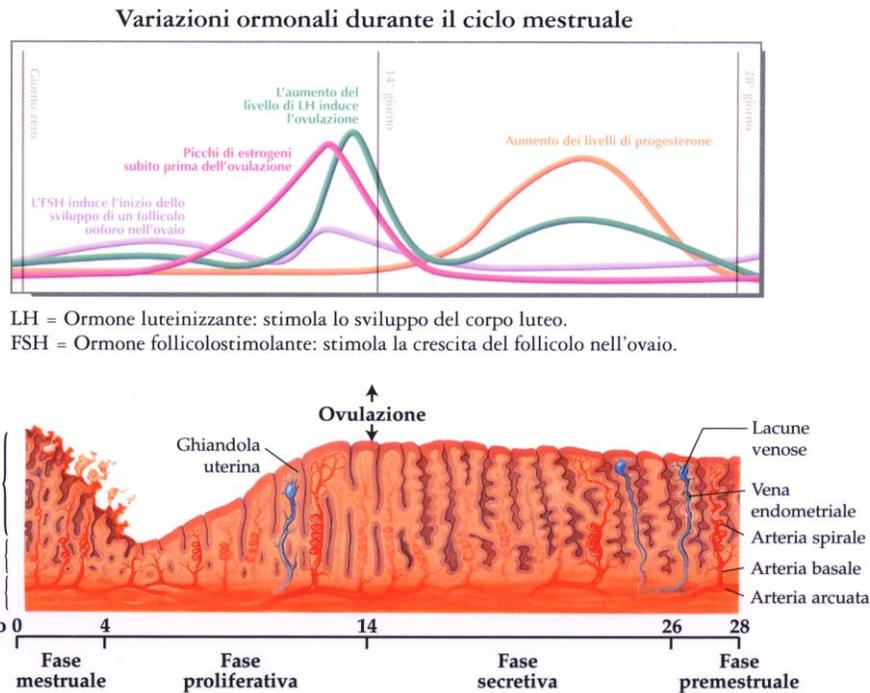


Fig. 7 Controllo neuroendocrino del ciclo mestruale.

Durante la fase follicolare, il follicolo in via di sviluppo secerne grandi quantità di estrogeni che, tra i molteplici effetti, hanno la capacità di stimolare la crescita e la proliferazione delle componenti endometriali. Vasi sanguigni neoformati invadono il tessuto inspessito e si formano anche nuove cellule endometriali di tipo tubulare. L'estrogeno, inoltre, induce l'aumento dei recettori progestinici nell'utero. Appena

prima dell'ovulazione il follicolo smette di produrre estrogeno con conseguente abbassamento del livello ematico che tornerà ad aumentare solo dopo la formazione del corpo luteo. Gli estrogeni e il progesterone prodotti nella fase luteinica continuano a stimolare l'accrescimento dei vasi a spirale nell'endometrio e la secrezione da parte delle ghiandole di un muco ricco di nutrienti.

La funzione del tessuto endometriale accresciuto consiste nel fornire una continua fonte di sostanze nutritive all'ovocita eventualmente fecondato ed impiantato nell'utero.

Se l'ovocita non viene fecondato, il corpo luteo inizia a degenerare dopo 8 giorni terminando la produzione di estrogeni e progesterone.

Il conseguente crollo dei relativi valori ematici induce modificazioni emorragiche nell'endometrio uterino che portano all'inizio delle mestruazioni. Infatti, in assenza dello stimolo ormonale di estrogeni e progesterone, l'endometrio va incontro a necrosi. Le arteriole endometriali si costringono, l'apporto ematico diminuisce e il sangue penetra lo strato vascolare causando sanguinamento. Gradualmente lo strato più superficiale dell'endometrio si distacca dall'utero laddove è avvenuta l'emorragia. Le prostaglandine prodotte nell'utero stimolano la contrazione ritmica del miometrio che porta all'espulsione del sangue e delle cellule deciduali dell'endometrio.

LA PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA IN ITALIA

Per tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA) si intendono tutti quei procedimenti che comportano il trattamento di ovociti e di spermatozoi umani nell'ambito di un progetto finalizzato a realizzare una gravidanza.

L'accesso a queste metodiche può essere consigliato in casi di sterilità dovuta a danni tubarici irreversibili o a oligoastenoteratospermia di grado severo; in caso di subfertilità non risolvibile con trattamenti chirurgici o in caso di sterilità idiopatica.

Un'anamnesi accurata rappresenta il primo passo di rilievo nell'ambito del primo colloquio con la coppia infertile/sterile. Durante questa fase, infatti, può emergere una specifica causa di infertilità/sterilità e ciò può aiutare a focalizzare le successive valutazioni diagnostiche sui fattori più probabilmente responsabili della infertilità/sterilità stessa.

Le procedure di fecondazione in vitro sono attualmente rappresentate da una gamma di opzioni terapeutiche a diverso grado di invasività, sia tecnica che psicologica sulla coppia. Possono infatti essere divise in tecniche di I, II e III livello.

Tecniche di I Livello:

- inseminazione sopracervicale in ciclo naturale eseguita utilizzando tecniche di preparazione del liquido seminale;
- induzione dell'ovulazione multipla associata ad inseminazione sopracervicale eseguita utilizzando tecniche di preparazione del liquido seminale;
- eventuale crioconservazione dei gameti maschili.

Tecniche di II Livello:

(procedure eseguibili in anestesia locale e/o sedazione profonda):

- fecondazione in vitro e trasferimento dell'embrione (FIVET);
- iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI);
- prelievo testicolare dei gameti (prelievo percutaneo o biopsia testicolare);

- eventuale crioconservazione di gameti maschili e femminili ed embrioni (nei limiti delle normative vigenti);
- trasferimento intratubarico dei gameti maschili e femminili (GIFT), zigoti (ZIFT) o embrioni (TET) per via transvaginale ecoguidata o isteroscopica.

Tecniche di III Livello:

(procedure che necessitano di anestesia generale con intubazione):

- prelievo microchirurgico di gameti dal testicolo;
- prelievo degli ovociti per via laparoscopica;
- trasferimento intratubarico dei gameti maschili e femminili (GIFT), zigoti (ZIFT) o embrioni (TET) per via laparoscopica.

La legge impone che le tecniche di procreazione medicalmente assistita siano applicate in base a un principio di gradualità, al fine di evitare il ricorso ad interventi aventi un grado di invasività tecnica e psicologica più gravosa per i destinatari.

La tecnica FIVET (Fecondazione In Vitro ed Embryo Transfer) può essere riassunta in queste tappe: induzione dell'ovulazione, prelievo degli ovociti, valutazione della maturità ovocitaria e selezione, inseminazione, fecondazione, coltura dell'embrione e trasferimento in cavità uterina.

Durante l'induzione dell'ovulazione, farmaci specifici sono impiegati per stimolare le ovaie a produrre diversi ovociti maturi invece che un solo ovocita, come si sviluppa in un normale ciclo ovarico spontaneo. Questo al fine di potere fare una selezione e per poter contare su più ovociti da fecondare, sempre nel limite della legge in vigore.

I farmaci impiegati per periodi variabili da 5 a 10 giorni sono generalmente scelti in rapporto al programma scelto per la specifica paziente. Si usano prevalentemente ormoni proteici come le gonadotropine estratte da urine di donne in menopausa purificate o altamente purificate oppure le più moderne gonadotropine ottenute sinteticamente con le tecniche di DNA ricombinante (FSH, LH) che offrono evidenti vantaggi sul piano terapeutico.

Si utilizza anche il clomifene citrato, un antiestrogeno che offre il vantaggio della sua somministrazione orale ma che ha una indicazione terapeutica molto circoscritta.

Altri farmaci utilizzati sono gli analoghi del GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone analogues - ormoni che controllano il rilascio delle gonadotropine) che servono per sopprimere le ovaie prima della loro stimolazione al fine di potere avere una dinamica controllata e progressiva degli effetti dei farmaci utilizzati.

Punti cruciali nelle pratiche di fecondazione assistita sono il continuo monitoraggio ecografico volto a rilevare la crescita dei follicoli che contengono gli ovociti e la crescita dell'endometrio che si prepara ad accogliere l'embrione per l'impianto dopo il suo trasferimento in utero.

Inoltre i prelievi quotidiani di sangue e la determinazione su questi campioni delle concentrazioni degli estrogeni, progesterone ed LH, saranno il documento di una maturazione dei follicoli e degli ovociti contenuti nonché della adeguata preparazione dell'endometrio. Gli estrogeni cresceranno in funzione della crescita dei follicoli. L'LH avrà un picco di rialzo in concomitanza con l'ovulazione ed il progesterone rimarrà a livelli bassi fino ad ovulazione imminente quando inizierà a crescere per partecipare alla preparazione dell'endometrio all'impianto. Quando il processo di maturazione follicolare è avvenuto (circa 12/24 ore prima della ovulazione) si pratica una iniezione di hCG che simola il picco ovulatorio dell'LH e dopo circa 36 ore si dovrebbe ottenere l'ovulazione. E' importante provvedere al prelievo degli ovociti prima che questi cadano nella pelvi spontaneamente vanificando tutto il trattamento.

Il prelievo degli ovociti (pick-up) consiste nella aspirazione degli ovociti con un ago speciale posizionato in punta alla sonda della ecografia vaginale. La punzione delle ovaie attraverso questo strumento inserito in vagina si svolge in corso di anestesia ed ha una durata di circa 20 minuti (Fig.8).

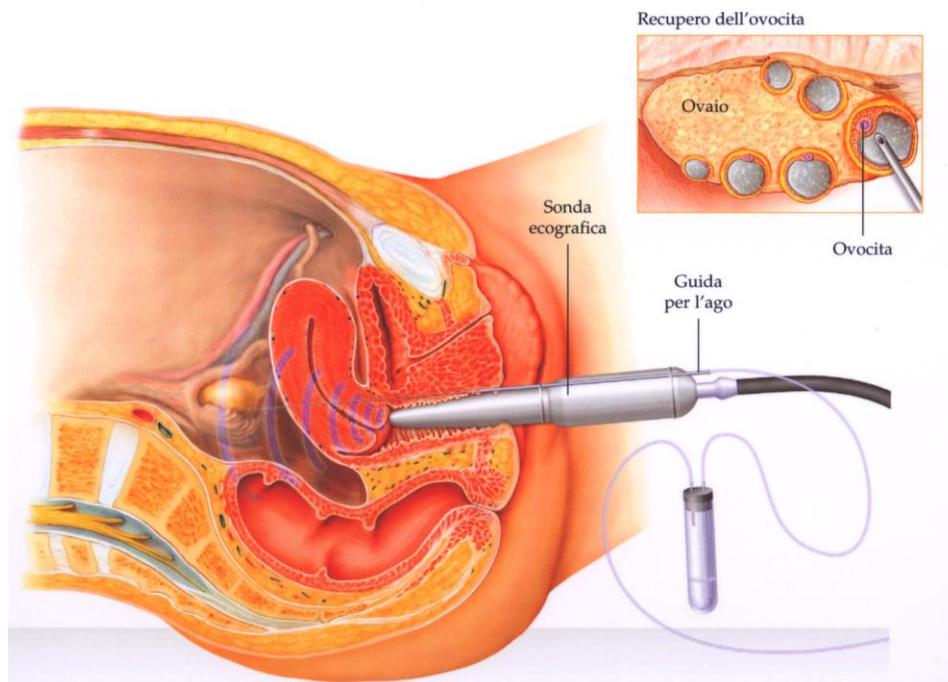


Fig. 8 Pick-up ovocitario.

Gli ovociti così prelevati saranno esaminati per la valutazione del grado di maturità e messi in incubazione con spermatozoi selezionati attraverso metodiche di separazione su gradiente.

Questa procedura è consigliata in casi di patologia tubarica, infertilità maschile di grado moderato, endometriosi. In caso di infertilità maschile di grado severo, azoospermia ostruttiva e secretiva, ridotto numero di ovociti, mancata o ridotta fecondazione in precedenti cicli di fecondazione in vitro, è possibile procedere con una tecnica di inseminazione diversa, l'ICSI (Intracitoplasmatic Sperm Injection) che consiste nella iniezione di uno spermatozoo all'interno dell'ovocita. A questa iniezione seguono la produzione di embrioni ed il loro trasferimento in cavità uterina. Independentemente dalla procedura di inseminazione utilizzata, dopo 16-18 ore l'ovocita è controllato per verificare che la fecondazione sia avvenuta con presenza dei due pronuclei.

Gli embrioni formati saranno trasferiti in utero dopo 48-72 ore dal pick-up ovocitario. Il trasferimento dell'embrione in cavità uterina avviene senza bisogno di anestesia e senza dolore con cateteri che, caricati degli embrioni, vengono immessi in cavità uterina e qui trasferiti. L'intera procedura richiede circa 10-20 minuti.

Dopo 14 giorni è possibile eseguire il test ematico di gravidanza (beta hCG).

L'accesso e l'uso delle tecniche PMA è disciplinato in Italia da una recente legge (Legge 19 febbraio 2004 n. 40 pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 45 del 24 febbraio 2004) che impone alcune restrizioni per i pazienti e gli operatori del settore. La legge in questione limita a 3 il numero di ovociti che possono essere fecondati durante ciascun ciclo di IVF ed obbliga il trasferimento simultaneo in utero di tutti e tre i possibili embrioni.

La crioconservazione di zigoti ed embrioni è vietata, mentre quella degli ovociti è permessa.

La legge 40, inoltre, vieta qualsiasi forma di diagnosi genetica sull'embrione; quindi in Italia non è più possibile eseguire la diagnosi preimpianto.

Qui di seguito vengono riportati in particolare due articoli tratti dal testo della legge in questione riguardanti l'embrione e la sua tutela:

Misure di tutela dell'embrione: sperimentazione sugli embrioni umani

(Articolo 13, Legge 40/2004)

1. **E' vietata qualsiasi sperimentazione su ciascun embrione umano.**
2. *La ricerca clinica e sperimentale su ciascun embrione umano e' 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 ... (omissis)

e) la diagnosi preimpianto a finalità eugenetica.

Ogni indagine relativa allo stato di salute degli embrioni creati in vitro, ai sensi dell'articolo 14, comma 5, dovrà essere di tipo osservazionale.

Qualora dall''indagine vengano evidenziate gravi anomalie irreversibili dello sviluppo di un embrione, il medico responsabile della struttura ne informa la coppia ai sensi dell'art. 14, comma 5.

Ove in tal caso il trasferimento dell'embrione, non coercibile, non risulti attuato, la coltura in vitro del medesimo deve essere mantenuta fino al suo estinguersi.

Limite all'applicazione delle tecniche sugli embrioni

(Articolo 14, Legge 40/2004)

1. E' 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 e' consentita, la crioconservazione degli embrioni stessi fino alla data del trasferimento, da realizzare non appena possibile. (omissis)
4. E' consentita la crioconservazione dei gameti maschile e femminile. previo consenso informato e scritto. (omissis)

Qualora il trasferimento nell'utero degli embrioni non risulti possibile per cause di forza maggiore relative allo stato di salute della donna non prevedibili al momento della fecondazione e, comunque, un trasferimento non risulti attuato, ciascun embrione non trasferito dovrà essere crioconservato in attesa dell'impianto che dovrà avvenire prima possibile.

Qualsiasi embrione che non sia trasferito in utero verrà congelato con onere a carico del centro di procreazione medicalmente assistita in attesa del futuro impianto.

Da queste basi nasce la necessità in Italia di cambiare oggetto di studio, quindi non più l'embrione ma l'ovocita. Essendo possibile inseminare un numero di ovociti non superiore a tre, per massimizzare le possibilità di gravidanza per la donna, è necessario individuare, attraverso metodi non invasivi, alcuni parametri che possano consentire una selezione a priori delle cellule uovo migliori.

SELEZIONE OVOCITARIA

La corretta valutazione della qualità ovocitaria è uno degli aspetti cruciali per l'esito delle tecniche di fecondazione assistita.

Questo aspetto diventa ancora più rilevante nei casi in cui la legge imponga la selezione e l'inseminazione di pochi ovociti per paziente. Questo è il caso dell'Italia, dove alla luce della nuova legislazione in materia di procreazione medicalmente assistita (*legge 19 febbraio 2004, n. 40*) la valutazione della qualità degli ovociti diventa di fondamentale importanza per la selezione di cellule uovo che potrebbero avere un maggiore potenziale di sviluppo e dare quindi una più elevata probabilità di gravidanza.

Con l'utilizzo dei tradizionali microscopi si è tentato di identificare parametri morfologici che potessero predire il potenziale di sviluppo dell'ovocita, come l'aspetto del citoplasma, lo spessore della zona pellucida, la morfologia del globulo polare.

I risultati di questi studi (Xia et al. 1997; Serhal et al. 1997; Balaban et al. 1998; Ebner et al. 2000) portano però alla conclusione che nessuna caratteristica morfologica può essere utilizzata con certezza per la selezione di ovociti di buona qualità.

Negli ultimi anni è stato possibile affiancare allo studio morfologico della cellula uovo anche lo studio di un ulteriore parametro, il fuso meiotico. Questo grazie all'utilizzo di un nuovo microscopio a luce polarizzata e ad orientamento indipendente, il Poloscopio (CRI, USA), accoppiato ad un software di processamento digitale dell'immagine che permette di visualizzare strutture macromolecolari ordinate, come il fuso meiotico o i diversi strati della zona pellucida, sulla base della loro rifrangenza.

Valutazione di parametri morfologici soggettivi

Nella tecnica FIVET le cellule della corona e del cumulo che circondano l'ovocita non permettono un'accurata valutazione della maturità e della morfologia della cellula uovo. Al contrario, l'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo offre la possibilità di valutare l'ovocita denudato delle cellule che lo avvolgevano per verificare come le sue caratteristiche morfologiche possano in qualche modo influenzare la fertilizzazione, questo è stato infatti lo scopo di diversi gruppi di ricerca. I parametri valutabili sono: la maturazione nucleare (vescicola germinale, metafase I, metafase II), la forma, l'aspetto della zona pellucida, lo spazio perivitellino e il citoplasma che può presentare inclusioni o granulosità.

Alcuni gruppi (Balaban et al. 1998; De Sutter et al. 1996) non hanno trovato correlazione tra morfologia ovocitaria e tasso di fertilizzazione o qualità embrionaria dopo ICSI ($P>0,05$), come è mostrato nelle due tabelle (Tab.1-2).

Morfologia ovociti	n°ovociti iniettati	Ovociti danneggiati	0 PN	1 PN	2 PN (%)	3 PN	Embryo score
Normale	194	6	44	2	135 (72)	7	3.08±1.07
Una anomalia	206	10	45	13	129 (66)	9	3.12±1.17
Due anomalie	128	4	37	5	78 (63)	4	3.25±1.09
Tipi di anomalie							
Citoplasma scuro	3	/	1	/	2 (67)	/	3.30±0.30
Zona pellucida scura	136	10	24	6	94 (75)	2	3.31±1.05
SP largo	66	1	21	3	39 (60)	2	3.52±1.02
Corpi refrattari	98	1	26	10	57 (59)	4	3.24±1.14
Incorporazioni scure	105	5	25	2	68 (68)	5	3.07±1.13
Spots	24	/	6	/	17 (71)	1	2.96±1.26
Forma irregolare	28	1	8	/	18 (67)	1	2.89±1.15
Vacuoli	24	1	9	2	10 (43)	2	3.00±1.04
Vacuoli multipli	6	2	2	/	2 (50)	/	2.10±1.50
Totale	528	20	126	20	342 (67)	20	3.14±1.12

Tab. 1 Tasso di fertilizzazione e qualità embrionaria di ovociti con morfologia normale e di ovociti con anomalie (De Sutter et al. 1998). PN = pronuclei; SP = spazio perivitellino.

Morfologia ovociti	n° ovociti iniettati	n° ovociti degenerati (%)	n° ovociti fertilizzati (%)	Embrioni clivati (%)	Embrioni grado I-II (%)	Embrioni grado III-IV (%)
Normale	2180	69 (3,1)	1589 (72,8)	1540 (96,9)	1097 (71,2)	443 (28,8)
ZP scura	498	14 (2,8)	360 (72,2)	351 (97,5)	261 (74,3)	90 (25,7)
SP largo	864	20 (3,2)	620 (71,7)	607 (97,9)	437 (71,9)	170 (28,1)
Citoplasma scuro	620	22 (3,5)	445 (71,7)	431 (96,8)	323 (74,9)	108 (25,1)
Citoplasma granulare	158	5 (3,1)	115 (72,7)	109 (94,7)	81 (74,3)	28 (25,7)
CR	167	10 (5,9)	113 (67,6)	108 (95,5)	79 (73,1)	29 (26,9)
Forma anomala	223	7 (3,1)	166 (74,4)	162 (97,5)	122 (75,3)	40 (24,7)
2 anomalie	971	30 (3,0)	711 (73,2)	699 (98,3)	491 (70,2)	208 (29,8)
3 anomalie	222	16 (2,7)	161 (72,5)	155 (96,7)	109 (70,3)	46 (29,7)

Tab. 2 Tasso di fertilizzazione, di clivaggio e qualità embrionaria di ovociti con morfologia normale e di ovociti con anomalie (Balaban et al. 1996). PN = pronuclei; SP = spazio perivitellino; ZP = zona pellucida; CR = corpi refrattari.

Risultati opposti sono invece mostrati in un altro studio (Xia et al. 1997). In questo caso sono stati utilizzati quattro gradi per classificare la morfologia ovocitaria, in base allo stato del primo globulo polare, alle dimensioni dello spazio perivitellino e alla presenza o meno di inclusioni citoplasmatiche. Nella tabella (Tab.3) sono mostrati i risultati della fertilizzazione e dello sviluppo embrionale di ovociti inseminati attraverso ICSI che mostravano o meno inclusioni citoplasmatiche.

Grado ovocita	Primo GB	SPV	Ovociti senza inclusioni citoplasmatiche			Ovociti con inclusioni citoplasmatiche		
			n° ovociti fertilizzati (%)	n°embrioni a 3-8 cell (%)	n°embrioni grado I-II (%)	n° ovociti fertilizzati (%)	n°embrioni a 3-8 cell (%)	n°embrioni grado I-II (%)

1	framm	largo	45 (60,8)	18 (24,3)	21 (28,4)	12 (60,0)	4 (20,0)	6 (30,0)
2	intatto	largo	70 (72,9)	36 (37,5)	36 (37,5)	20 (71,4)	6 (21,4)	9 (32,1)
3	framm	normale	58 (84,1)	38 (55,1)	27 (39,1)	13 (76,5)	7 (42,2)	7 (41,2)
4	intatto	normale	107 (84,9)	76 (60,3)	84 (66,7)	20 (64,5)	13 (41,9)	14 (45,2)
P value			< 0,01	< 0,01	< 0,01	NS	NS	NS

Tab. 3 Relazione tra fertilizzazione, qualità embrionaria e la presenza o meno di inclusioni citoplasmatiche negli ovociti inseminati. Framm = frammentato; GB = globulo polare; SPV = spazio perivitellino; NS = non significativo.

Gli ovociti di grado 3-4 senza inclusioni citoplasmatiche mostrano un tasso di fertilizzazione significativamente più alto rispetto a quelli di grado 1-2 sempre senza inclusioni citoplasmatiche ($P < 0,01$). Allo stesso modo la maggior percentuale di embrioni (66,7%) di grado I-II risulta derivare da ovociti di grado 4 ($P < 0,01$).

Invece per gli ovociti che mostravano inclusioni citoplasmatiche non è stata evidenziata nessuna differenza significativa tra grado (1-4) e corrispettivo tasso di fertilizzazione e sviluppo embrionale. Comunque il tasso di fertilizzazione degli ovociti di grado 4 con inclusioni è significativamente inferiore (64,5%) rispetto a quello degli ovociti di grado 4 senza inclusioni (84,9%; $P < 0,01$). Inoltre la percentuale di embrioni di grado I-II derivanti da ovociti di grado 4 con inclusioni è significativamente inferiore (45,2%) rispetto alla percentuale di embrioni di grado I-II derivanti da ovociti di grado 4 senza inclusioni (66,7%; $P < 0,05$).

I dati indicano che lo stato del primo globulo polare, le dimensioni dello spazio perivitellino e la presenza di inclusioni citoplasmatiche correlano con lo sviluppo embrionale dopo l'ICSI. Il tasso di fertilizzazione e la qualità embrionale degli ovociti con un primo globulo polare intatto, un normale spazio perivitellino e senza inclusioni citoplasmatiche sono migliori se confrontati con quelli di ovociti che non possedevano queste caratteristiche. Questi risultati sembrano però essere in contrasto con quelli ricavati da altri studi (De Sutter et al. 1996) che non indicano la presenza di una correlazione tra morfologia e tasso di fertilizzazione o qualità embrionale. La differenza nei risultati potrebbe essere dovuta ai diversi criteri usati per valutare la morfologia ovocitaria.

E' stata evidenziata inoltre la presenza di una correlazione statisticamente positiva tra morfologia, tasso di gravidanza e frequenza di impianto (Serhal et al. 1997): è stato riscontrato un tasso di gravidanza più elevato in pazienti nelle quali erano stati trasferiti embrioni che derivavano solo da ovociti normali, rispetto a quello osservato nel caso di embrioni derivati da ovociti con anomalie citoplasmatiche (Tab.4).

	Gruppo A	Gruppo B			P value
	Citoplasma normale	Citoplasma granulare	Inclusioni citoplasmatiche	totale	
n° di embrioni	183	45	40	85	
Grado I+II	183	42	38	80	
Grado III	0	3	2	5	
Media del n° di embrioni trasferiti	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,6			>0,05
Tasso di gravidanza su transfer	17 (24%)	1 (3%)			0,008
Frequenza di impianto	19 (10%)	1 (1%)			0,007

Tab. 4 Tasso di gravidanza e frequenza di impianto in relazione alla morfologia ovocitaria dopo il trasferimento di embrioni ottenuti con ICSI.

Al gruppo A appartengono 183 embrioni derivati da ovociti di morfologia normale da un totale di 72 pazienti; al gruppo B appartengono 85 embrioni derivati da ovociti con anomalie citoplasmatiche da un totale di 72 pazienti, il numero medio di embrioni trasferiti per ogni paziente nei due gruppi è lo stesso in entrambi i gruppi ($P > 0,05$).

Naturalmente nel gruppo B non è possibile individuare le gravidanze in base al tipo di anomalia degli ovociti.

Nel gruppo A sono state rilevate 15 gravidanze singole e due gemellari, con un tasso di gravidanza su transfer del 24% e una frequenza di impianto del 10%, mentre una sola gravidanza è stata rilevata nel gruppo B con un tasso di gravidanza del 3% e una frequenza di impianto dell'1% ($P < 0,01$).

Come ulteriore parametro morfologico la presenza di un primo globulo polare liscio ed intatto è stata valutata come un fattore prognostico favorevole in termini di fertilizzazione, di qualità embrionaria e di tassi di impianto e gravidanza anche da altri lavori (Ebner et al. 1999; Ebner et al. 2000; Ebner et al. 2002)

In conclusione gli studi presenti in letteratura riguardo all'analisi di una possibile relazione tra morfologia ovocitaria e sviluppo embrionale portano a risultati molto discordanti tra loro. Queste divergenze potrebbero essere dovute all'utilizzo di diversi criteri per la valutazione ovocitaria, ma il problema maggiore è da evidenziare nel tentativo di analizzare parametri altamente soggettivi e qualitativi, quindi non misurabili.

Il Poloscopio

I parametri morfologici non hanno dato risultati significativi per la selezione di ovociti di buona qualità. Negli ultimi anni si è tentato quindi di affiancare all'analisi morfologica lo studio del fuso meiotico.

Il fuso meiotico può essere visualizzato usando tecniche come l'immunoistochimica o la microscopia elettronica ma in questi casi i campioni devono subire un processo di fissazione, rendendo i risultati utili per la ricerca ma non utilizzabili nella pratica clinica. Invece i microscopi utilizzati comunemente in un laboratorio PMA non permettono una sufficiente risoluzione per la visione del fuso meiotico.

Ad esempio i microscopi ad interferenza, analogamente ai microscopi a contrasto di fase, sono utilizzati per osservare strutture trasparenti non altrimenti visibili in campo chiaro e forniscono immagini più contrastate e con un effetto tridimensionale. Questo metodo di contrasto è conosciuto con il nome di "DIC" (Differential Interference Contrast) oppure "Normaski", dal nome dell'inventore della configurazione ottica che si ritrova negli odierni microscopi a contrasto interferenziale.

Però se il campione viene posto tra due filtri polarizzatori sovrapposti, alcune strutture diventano visibili perchè caratterizzate da una proprietà chiamata birifrangenza.

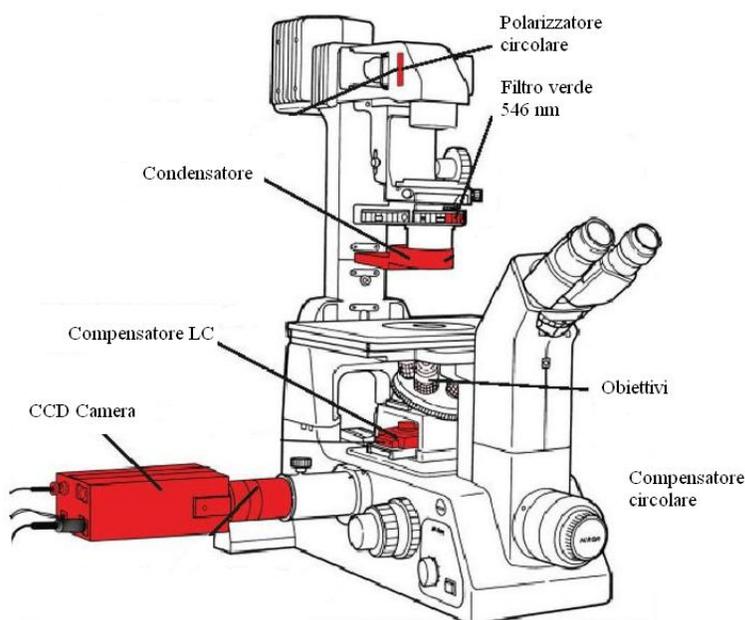


Fig. 9 Visione schematica delle principali componenti del Poloscopio.

Inouè (1953) è stato il primo ad utilizzare un microscopio a luce polarizzata per osservare il fuso mitotico e meiotico in cellule in coltura in modo non invasivo, sfruttando la birifrangenza dei microtubuli.

Infatti i microtubuli, essendo composti da molecole ordinate, influenzano lo stato della luce polarizzata. Nelle strutture cellulari anisotrope (tubulina, actina, collagene, miosina...) le proprietà fisiche, come l'indice di rifrazione, dipendono dalla direzione in cui si analizza la struttura stessa. Le componenti cellulari birifrangenti contengono due assi ottici ortogonali, asse ottico veloce e asse ottico lento, lungo i quali l'indice di rifrazione, cioè un parametro che rappresenta il fattore numerico per cui la velocità di propagazione di una radiazione elettromagnetica viene rallentata, rispetto alla sua velocità nel vuoto, quando questa attraversa un materiale, è diverso (Fig.10).

L'indice di rifrazione lungo l'asse ottico lento è maggiore rispetto a quello lungo l'asse ottico veloce, quindi la luce polarizzata parallela all'asse lento lo percorre ad una velocità inferiore rispetto alla luce polarizzata parallela all'asse veloce.

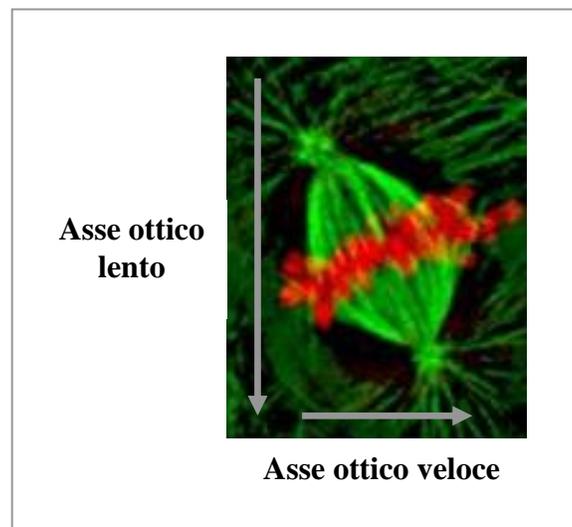


Fig. 10 Il fuso meiotico come struttura birifrangente.

Come risultato di questo, le due componenti di luce, che sono in fase al momento dell'entrata nel campione, sono fuori fase dopo averlo attraversato. La ritardanza è la misura in nanometri (nm) della differenza che si viene a creare tra i due assi (Fig.11).

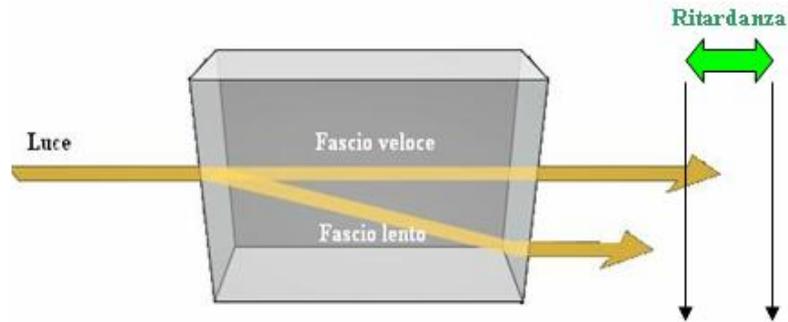


Fig. 11 Valutazione e misurazione della ritardanza.

La birifrangenza consente di analizzare strutture cellulari, come il fuso meiotico, evitando l'utilizzo di marcatori fluorescenti o immunoistochimici.

Nonostante questo, i microscopi convenzionali a luce polarizzata hanno una sensibilità limitata causata soprattutto dall'utilizzo di un sistema orientamento-dipendente: la visualizzazione del fuso dipende dal suo orientamento rispetto alla direzione di provenienza della luce polarizzata, facendo di conseguenza variare anche la misura della ritardanza che non risulta quindi attendibile.

Un nuovo e particolare microscopio, il Poloscopio (Cambridge Research & Instrumentation, Inc. [Cri], USA), supera queste limitazioni perché permette la visualizzazione del fuso in modo indipendente dal suo orientamento.

Lo strumento è costruito sulla base dei tradizionali microscopi a luce polarizzata, la differenza sta nella sostituzione del convenzionale compensatore con un compensatore chiamato "universale" costituito da due sistemi a cristalli liquidi (LC). Il vantaggio di questo compensatore è dato dal fatto che permette di cambiare lo stato di polarizzazione della luce senza muovere componenti meccaniche e senza variazioni nell'immagine.

Il Poloscopio è accoppiato ad un software di processamento digitale dell'immagine. L'intero processo genera quattro immagini ottenute a diversi stati di polarizzazione che sono processate usando avanzati algoritmi. I segnali di fondo sono in seguito

rimossi per avere una maggiore sensibilità e pulizia dell'immagine di ritardanza che è resa, dal punto di vista qualitativo, attraverso una scala di grigio di diversa intensità.

Bisogna ricordare inoltre che questo sistema non è invasivo e non ha effetti tossici sulla cellula, questo è stato dimostrato da studi precedenti eseguiti sul topo come modello animale: l'uso del Poloscopio non compromette lo sviluppo embrionale prima dell'impianto e non compromette il tasso di gravidanza degli embrioni derivati da ovociti analizzati con questa tecnica (Liu et al. 2000a; Keefe et al. 1997).

Quantitativamente il sistema permette di misurare la ritardanza del fuso meiotico e dei diversi strati della zona pellucida.

Fuso meiotico

Il vantaggio che deriva dall'utilizzo di questo sistema a luce polarizzata sta nel poter ricavare dati importanti per la caratterizzazione del fuso. La ritardanza è infatti direttamente proporzionale alla densità e all'integrità dei microtubuli. Alcuni studi (Sato et al. 1975; Liu et al. 2000b) hanno verificato che ovociti in cui non sia possibile visualizzare il fuso meiotico tramite la luce polarizzata, in realtà hanno un fuso disassemblato e con i cromosomi non allineati correttamente ed è stato possibile verificarlo tramite la microscopia confocale.

Diversi fattori sia biologici che fisici come temperatura, età materna, ph e il trattamento dell'ovocita, influenzano la stabilità del fuso (Battaglia et al. 1996; Wang et al. 2001a). Uno studio sull'effetto della temperatura illustra che un controllo rigoroso della temperatura mantenuta a 37° C, stabilizza il fuso meiotico e aumenta la probabilità di fertilizzazione (Wang et al. 2001b)

Zona pellucida

la zona pellucida è un rivestimento glicoproteico dell'ovocita, in particolare è costituita da tre glicoproteine (ZP1, ZP2, ZP3) le quali sono sintetizzate e secrete dalla cellula uovo durante l'ovogenesi. Lo spermatozoo può penetrare all'interno dell'ovocita grazie al legame con queste glicoproteine. Dopo la fertilizzazione la zona pellucida ha la funzione di proteggere l'embrione in divisione durante il suo percorso verso l'utero dove avverrà l'impianto in seguito alla fuoriuscita dell'embrione dalla zona (hatching).

La struttura multistratificata della zona pellucida è solo debolmente percettibile con i microscopi convenzionali, il Poloscopio invece consente di distinguere i diversi strati

grazie alla loro diversa birifrangenza. Gli strati della zona pellucida sono tre: nello strato più interno le fibre sono ordinate e disposte radialmente rispetto all'ovocita; nello strato intermedio le fibre sono disposte senza un particolare ordine; nello strato più esterno le fibre sono ordinate e disposte in modo tangenziale alla superficie della cellula. Inoltre lo strato più interno è più spesso rispetto a quello più esterno e rispetto all'intermedio (Fig.12).

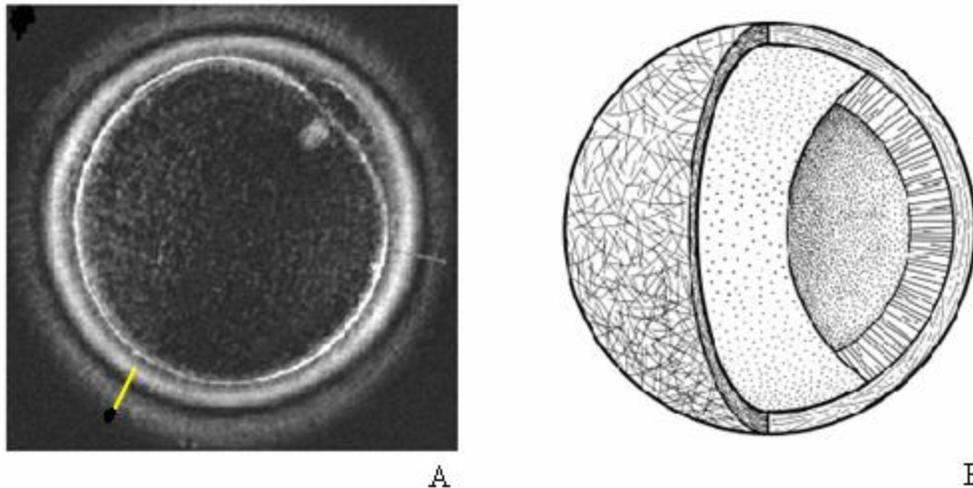


Fig. 12 A. Ovocita visualizzato attraverso il Poloscopio: la linea gialla indica i tre strati della zona pellucida, lo strato intermedio non mostra rifrangenza; B. visione schematica della zona pellucida che mostra il diverso orientamento delle fibre nei tre strati.

Di conseguenza, essendo strutture ordinate, lo strato interno e quello esterno sono visibili grazie al Poloscopio ed essendo lo strato interno più spesso mostra una ritardanza più elevata. Invece lo strato intermedio è disorganizzato e non è perciò visibile.

Valutazione di parametri oggettivi

Diversi studi dimostrano l'esistenza di una correlazione tra la presenza del fuso meiotico in ovociti in metafase II e una buona percentuale di fertilizzazione. Un fuso meiotico normale è di fondamentale importanza per assicurare un corretto allineamento dei cromosomi e una corretta separazione. La distruzione del fuso può portare alla perdita di cromosomi e può contribuire ad aberrazioni cromosomiche numeriche come le aneuploidie (ad esempio monosomie o trisomie). Queste

aberrazioni cromosomiche numeriche sono la causa frequente di fertilizzazioni anomale, degenerazione precoce dell'embrione, aborto spontaneo e malattie ereditarie, soprattutto in donne sopra i 40 anni di età.

Infatti la percentuale di ovociti con fuso meiotico alterato è minore nelle donne più giovani (Battaglia et al. 1996), è possibile quindi correlare l'integrità del fuso meiotico all'età materna.

Uno studio (Wang et al 2001c) ha verificato che su un totale di 533 ovociti analizzati attraverso il Poloscopio, il 39% non presentava un fuso meiotico visibile. Di questi solo il 44% ha mostrato una fertilizzazione normale rispetto al 62% degli ovociti che possedevano un fuso ben visibile. Un lavoro dello stesso autore (Wang et al 2001a) dimostra che la presenza di un fuso birifrangente in ovociti umani può aumentare non solo la probabilità di fertilizzazione ma anche quella di ottenere un buon sviluppo embrionale. Infatti il 51% degli ovociti con fuso visibile arrivano a blastocisti rispetto al 30% degli ovociti che non mostravano segnale.

Questi risultati sono confermati da un ulteriore studio (Moon et al. 2003): la percentuale di embrioni di alta qualità che si sviluppano da ovociti con fuso visibile è significativamente maggiore rispetto a quella con ovociti senza fuso visibile (64.2% versus 35.9%)

Analoghi dati sono stati ottenuti da Rienzi et al. (2003). Il 9% degli ovociti da loro analizzati non presentava un fuso birifrangente visibile; questi ovociti hanno mostrato un tasso di fertilizzazione basso, del 33.3%. Sempre in questo studio è stato verificato che negli ovociti con fuso visibile il tasso di fertilizzazione non è dipendente dalla posizione del fuso per angoli $<90^\circ$, mentre ovociti con angoli $>90^\circ$ hanno un tasso di fertilizzazione più basso e un tasso di fertilizzazione anomala maggiore.

Quindi la presenza di un fuso meiotico integro all'interno dell'ovocita è un parametro che può essere valutato tramite l'utilizzo del Poloscopio ma rappresenta un criterio qualitativo. Per affinare l'analisi è necessario individuare parametri quantitativi, analizzabili attraverso il Poloscopio, che permettano di selezionare gli ovociti migliori.

In recenti studi infatti sono stati considerati alcuni parametri come la ritardanza del fuso meiotico, la sua lunghezza, ma anche caratteristiche riguardanti i diversi strati della zona pellucida come ancora la ritardanza e lo spessore dei diversi strati.

In un recente lavoro (Rama et al. 2007) è stata eseguita l'analisi al Poloscopio di 205 ovociti in metafase II ottenuti da 25 pazienti tra i 25 e i 40 anni sottoposte a stimolazione ormonale.

Il fuso meiotico è stato visualizzato in 160 ovociti (78%) mentre non è stato possibile osservarlo nei restanti 45 ovociti (22%).

Su 160 ovociti con fuso meiotico visibile, 132 (82,5%) fertilizzano, e di questi 64 (48,5%) si sviluppano a blastocisti; invece su 45 ovociti che non hanno mostrato la presenza di fuso meiotico, 14 (31,1%) fertilizzano e solo 2 (14,3%) si sviluppano a blastocisti (Tab.5).

	n° di ovociti (%)	n° di ovociti fertilizzati (%)	n° di embrioni che procedono a blastocisti (%)
con fuso meiotico	160 (78.0)	132 (82.5)	64 (48.5)
senza fuso meiotico	45 (22.0)	14 (31.1)	2 (14.3)

Tab. 5 Correlazione tra presenza del fuso meiotico, fertilizzazione e sviluppo embrionale.

Essendo uno studio retrospettivo i valori di ritardanza e di lunghezza del fuso meiotico non sono stati utilizzati per la scelta delle cellule uovo da inseminare ma sono stati valutati in seguito per verificare quali valori di questi parametri corrispondessero agli ovociti che hanno mostrato un buon sviluppo embrionale progredendo fino allo stadio di blastocisti.

In Italia non è attualmente possibile eseguire questa tipologia di studio a causa del numero limitato di ovociti che è possibile inseminare (legge 19 febbraio 2004, n. 40). Dei 160 ovociti con un fuso meiotico visibile 64 progrediscono a blastocisti (48.5%) e la maggior parte di questi (60.9%) aveva mostrato all'analisi al Poloscopio una ritardanza >3 nm (Tab.6).

Ritardanza fuso meiotico (nm)	n° di blastocisti (%)
> 3 nm	39 (60.9)
2-3 nm	16 (25.0)

Tab. 6 Correlazione tra ritardanza media del fuso meiotico e sviluppo a blastocisti.

In conclusione questo studio dimostra che la presenza del fuso e l'analisi quantitativa della sua ritardanza possono essere messi in correlazione con la qualità dell'ovocita ricavando informazioni sulle sue potenzialità di sviluppo: alti valori di ritardanza (>3 nm) sembrano essere correlati positivamente con un buon sviluppo dell'embrione fino a blastocisti.

Alla stessa conclusione sono giunti anche gli autori di un altro recente lavoro (Shen et al. 2006) nel quale sono stati analizzati tramite l'utilizzo del Poloscopio, 897 ovociti in MII, inseminati tramite ICSI indipendentemente dai valori di ritardanza misurati. Dopo 18 ore dalla fertilizzazione è stata valutata la qualità dei pre-embrioni attraverso l'analisi dei pronuclei secondo il sistema di classificazione Scott e Smith 1998 parzialmente modificato (Fig.13).

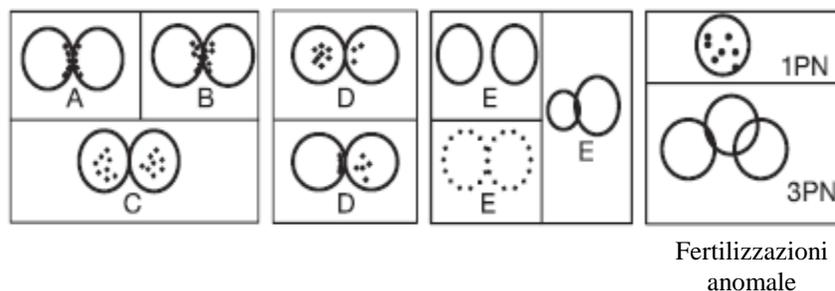


Fig. 13 Metodo di classificazione dei pre-embrioni basata sul numero dei pronuclei e sul numero e sulla disposizione dei nucleoli (modificazione della classificazione Scott e Smith 1998).

Su 897 ovociti, 739 (82,4%) possedevano il fuso meiotico, 158 (17,6%) non mostravano alcun segnale.

Tra i 739 ovociti con il fuso, 676 (91,5%) hanno fertilizzato; mentre tra i 158 ovociti senza fuso, 116 (73,4%) hanno fertilizzato (Tab.7).

	n° di ovociti (%)	n° di ovociti fertilizzati (%)
con fuso meiotico	739 (82.4)	676 (91.5)
senza fuso meiotico	158 (17.6)	116 (73.4)

Tab. 7 Correlazione tra presenza del fuso meiotico e fertilizzazione in seguito a ICSI.

Anche in questo caso si tratta di uno studio retrospettivo quindi i valori di ritardanza del fuso meiotico non sono stati utilizzati per la scelta delle cellule uovo da inseminare ma sono stati valutati in seguito per verificare una eventuale correlazione tra valori di ritardanza e fertilizzazione ed eventuale gravidanza.

Però non è possibile sapere quale sia la qualità dell'embrione che ha dato la gravidanza.

Quindi gli autori di questo studio hanno valutato la percentuale di gravidanze suddividendo le pazienti in gruppi: pazienti a cui sono stati trasferiti 2 o 3 embrioni che erano stati classificati come A, B o C, pazienti a cui è stato trasferito un embrione che era stato classificato come A, B o C, pazienti a cui non è stato trasferito nessuno embrione che era stato classificato come A, B, o C.

Dalla tabella si può notare che un maggior numero di gravidanze è stato ottenuto nei gruppi di pazienti a cui erano stati trasferiti da 1 a 3 embrioni i quali avevano mostrato un PN score A, B o C. Questi embrioni inoltre corrispondono agli ovociti che avevano mostrato all'analisi al Poloscopio una ritardanza del fuso meiotico più elevata (Tab.8).

PN-score degli embrioni trasferiti	n° pazienti	età media materna	n° embrioni trasferiti	gravidanze (% nel gruppo)	ritardanza media fuso meiotico (nm)
≥ 2 con qualità A-C	32	31.6 ± 4.6	82	14 (43.8)	1.78 ± 0.47
1 con qualità A-C	36	32.6 ± 4.3	92	17 (47.2)	1.63 ± 0.45
Nessuno con qualità A-C	35	33.0 ± 3.6	94	11 (31.4)	1.55 ± 0.36
Totale embrioni trasferiti	103	32.4 ± 4.2	268	42 (40.8)	1.66 ± 0.43

Tab. 8 Valutazione della percentuale di gravidanze e dei valori di ritardanza del fuso meiotico sulla base del PN-score che gli embrioni trasferiti avevano mostrato.

Gli studi sopra illustrati sono gli unici che in letteratura affrontano questo argomento con lo scopo di definire i valori ottimali di ritardanza del fuso meiotico e quindi di dare la possibilità di selezionare a priori gli ovociti migliori, con più alta probabilità di buon sviluppo embrionale, soprattutto nei paesi come l'Italia dove non è possibile ottenere un numero di embrioni superiore a tre.

Inoltre nei lavori di Rama e Shen sono stati presi in considerazione altri parametri, sempre valutabili quantitativamente attraverso l'utilizzo del Poloscopio, come la lunghezza del fuso e lo spessore e la ritardanza dello strato più interno della zona pellucida.

L'evidenza di questi dati porta a supporre una correlazione positiva tra alti valori di ritardanza del fuso meiotico, tasso di fertilizzazione e percentuale di gravidanze.

DISEGNO SPERIMENTALE

Lo scopo di questa tesi è quello di presentare alcuni dati ottenuti nei mesi di internato trascorsi presso l'U.O. di Fisiopatologia della Riproduzione dell'Ospedale "Cervesi" di Cattolica e di mostrare le verifiche effettuate come tentativo di dare una spiegazione alle nostre osservazioni. Infatti questi dati ci portano inevitabilmente ad analizzare con atteggiamento critico ciò che emerge dalla letteratura dove viene mostrata la presenza di una correlazione positiva tra alti valori di ritardanza del fuso meiotico, tasso di fertilizzazione e percentuale di gravidanze.

Osservazioni

Un totale di 100 ovociti è stato analizzato sia attraverso l'utilizzo di microscopi convenzionali sia attraverso il sistema a luce polarizzata. L'ICSI è stata effettuata sugli ovociti che mostravano una migliore morfologia accoppiata a valori di ritardanza superiori ai 2 nm.

L'analisi delle fertilizzazioni ha però mostrato risultati in contrasto con quelli presenti in letteratura, infatti il 60% degli ovociti sottoposti ad ICSI con ritardanza elevata, analizzati 18-19 ore dopo l'inseminazione, sono andati incontro a degenerazione o hanno mostrato una alterata fertilizzazione per la presenza di solo un pronucleo o anche per la mancanza degli stessi (Fig.14).

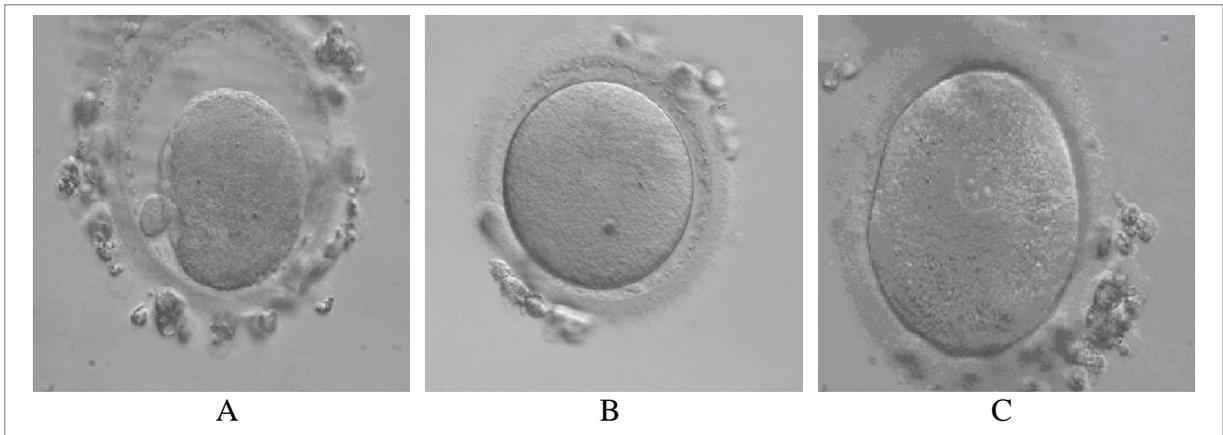


Fig. 14 A. Ovocita degenerato; B. ovocita con 0 pronuclei; C. ovocita con 1 pronucleo.

Lo studio si basa anche su un ulteriore dato: l'osservazione di ovociti particolari che mostrano un fuso meiotico in estrusione ma con già un globulo polare nello spazio perivitellino (Fig.15 A-B-C-D), quindi non normali cellule in telofase I (Fig.16).

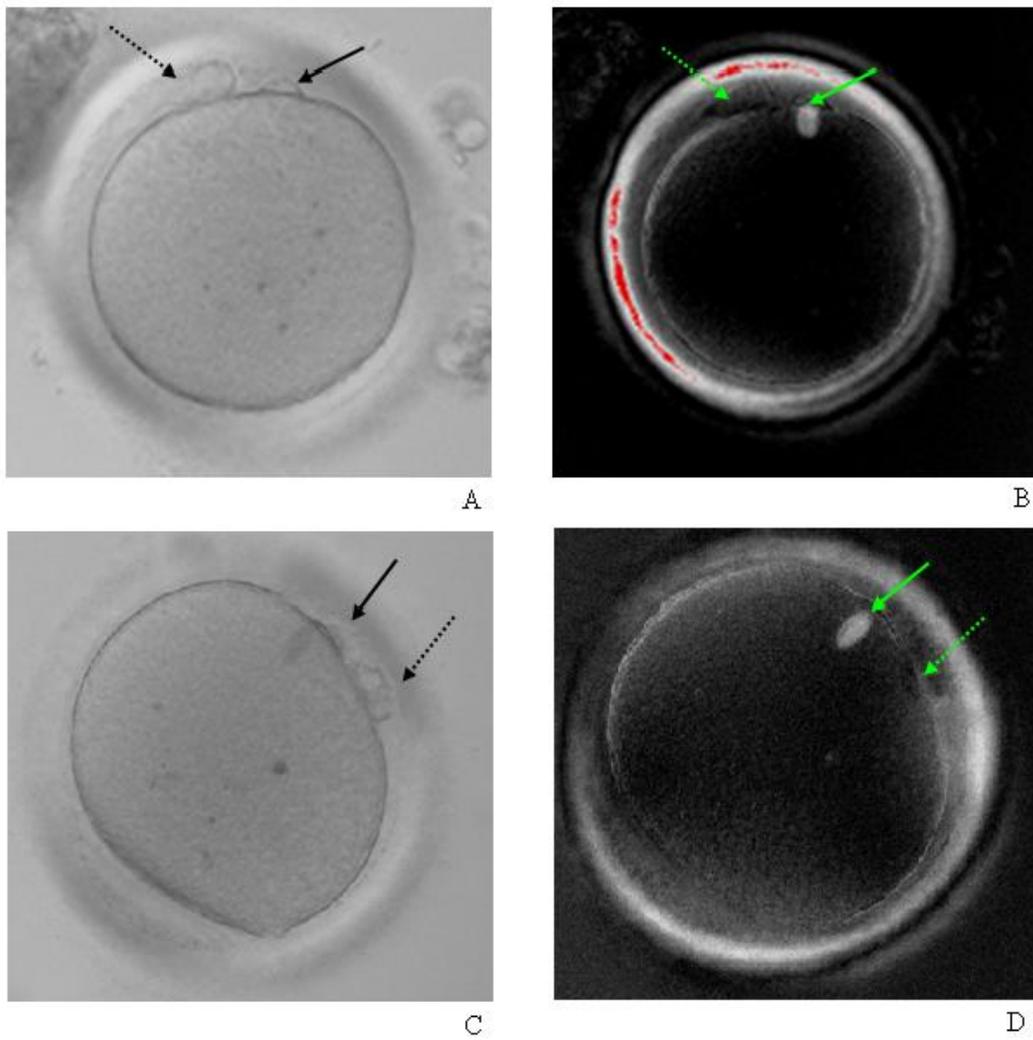


Fig. 15 (A-C) ovociti osservati all'invertoscopia al 20X: la freccia tratteggiata indica il globulo polare, la freccia continua indica un secondo globulo polare in estrusione. (B-D) ovociti osservati al Poloscopia, la freccia continua mette in evidenza il fuso meiotico.

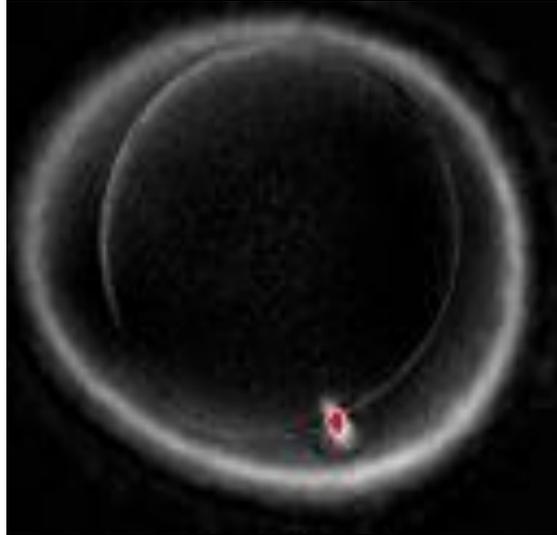


Fig. 16 Ovocita in telofase I.

Ipotesi

Da queste osservazioni nascono due ipotesi. La prima ipotesi prende in considerazione la possibilità che in realtà gli ovociti sottoposti ad ICSI con valori di ritardanza superiori ai 2 nm non fossero cellule in metafase II ma in realtà cellule in metafase I con la presenza di un globulo polare nello spazio perivitellino, probabilmente privo di materiale genetico, questa ipotesi nasce anche dall'osservazione che ovociti in metafase I mostrano una elevata ritardanza del fuso meiotico, con valori superiori a 2 nm (Fig.17). In questo caso la degenerazione e le fertilizzazioni anomale potrebbero essere spiegate con il fatto che l'inseminazione sia stata eseguita su cellule con un corredo cromosomico ancora 4n.

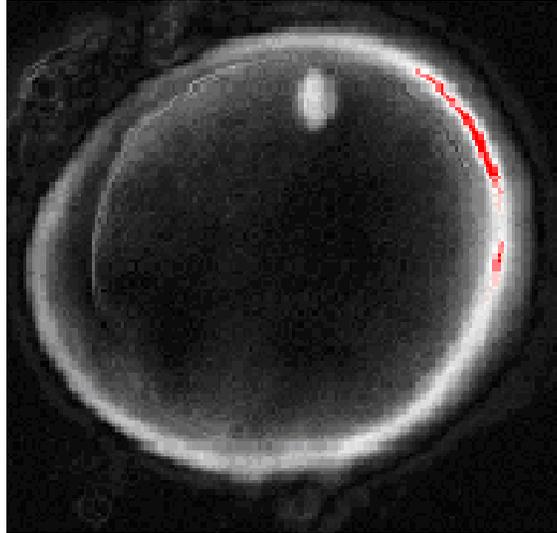


Fig. 17 Ovocita in metafase I. La ritardanza del fuso meiotico corrisponde ad un valore di 2.53 nm.

La seconda ipotesi invece prende in considerazione l'evento opposto, cioè che questi particolari ovociti siano stati attivati precocemente attraverso un meccanismo partenogenico, indipendente dall'incontro con lo spermatozoo. Questa spiegazione nasce da alcuni studi presenti in letteratura che mostrano in ovociti di topo attivati artificialmente un aumento della ritardanza del fuso meiotico, dal momento dell'attivazione all'estrusione del secondo globulo polare (Liu et al. 2000b, Navarro et al. 2005).

In questo caso la degenerazione e le fertilizzazioni anomale sarebbero dovute all'inseminazione di ovociti ad uno stadio maturativo avanzato perché già attivati attraverso un meccanismo partenogenico.

Materiali e Metodi

La presenza di DNA all'interno del globulo polare è stata verificata attraverso tecniche di colorazione in fluorescenza usando Propidio Ioduro (PI) e 4'.6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI).

Questo protocollo è stato eseguito sul primo globulo polare di 20 ovociti che non sono stati sottoposti ad inseminazione: 10 con alti valori di ritardanza del fuso meiotico, 10 con valori di ritardanza inferiori ai 2 nm, quindi realmente in metafase II, usati come controllo.

La seconda ipotesi invece è stata verificata indirettamente, valutando per prima cosa l'aumento di ritardanza del fuso meiotico nelle fasi successive all'inseminazione tramite ICSI in ovociti umani.

Biopsia del primo globulo polare e fissaggio

La biopsia del primo globulo polare è stata effettuata utilizzando delle apposite pipette (COOK K-PBBP-20-35) con un diametro interno di 20 μm ed esterno di 28 μm (Fig.18).



Fig. 18 Biopsia del primo globulo polare.

Successivamente il globulo polare è stato lavato in PBS buffer (Euroclone ECB4053L) e trasferito su un vetrino preventivamente lavato in alcool.

Osservando il globulo polare al microscopio invertito, il fissaggio è stato eseguito con Acido Acetico e Metanolo (1:3) preparato sul momento e raffreddato a -20°C e successivamente abbiamo sottoposto a colorazione tramite Propidio Ioduro e DAPI i globuli polari fissati.

Colorazione del DNA con Propidio Ioduro

Il Propidio Ioduro (PI) è una molecola fluorescente capace di marcare il DNA intercalandosi tra le basi senza riconoscere una specifica sequenza, e con una stechiometria che corrisponde a una molecola ogni 4-5 coppie di basi.

Il Propidio Ioduro lega anche l'RNA, quindi è necessario trattare il campione con nucleasi per distinguere il DNA marcato dall'RNA.

Il Propidio Ioduro non ha la capacità di passare le membrane cellulari, infatti è comunemente usato per identificare cellule non più vitali o cellule permeabilizzate.

Quando è legato al DNA, l'eccitazione massima corrisponde a 535 nm, mentre l'emissione massima a 617 nm (Fig.19) quindi emette nello spettro del rosso.

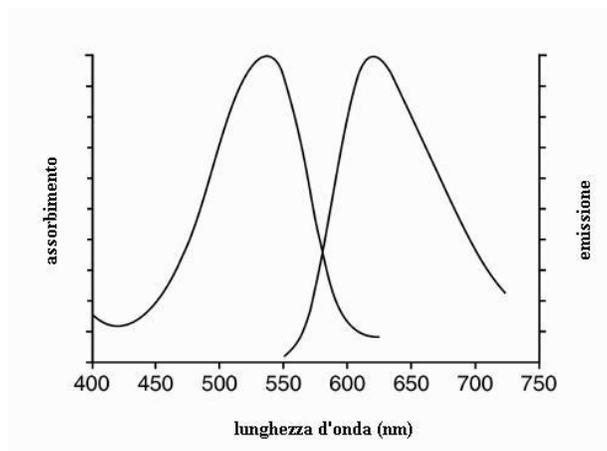


Fig. 19 Spettro di assorbimento e di emissione della molecola fluorescente di Propidio Ioduro.

I vetrini sono stati colorati usando una soluzione di Propidio Ioduro 500 nM ottenuta diluendo la soluzione stock (Invitrogen) 1.5 M con 2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodio citrato, pH 7.0). I preparati sono stati coperti con circa 100 μ l di soluzione diluita, lasciandoli ad incubare per circa 5 minuti. Dopo due tre lavaggi in 2X SSC i campioni sono stati visualizzati al microscopio a fluorescenza usando appropriati filtri.

Colorazione del DNA con 4'.6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI)

Il 4'.6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) è una molecola fluorescente in grado di legare il DNA a doppia elica preferenzialmente nelle regioni ricche in Adenina e Timina nel solco minore della molecola di acido desossiribonucleico (Fig.20).

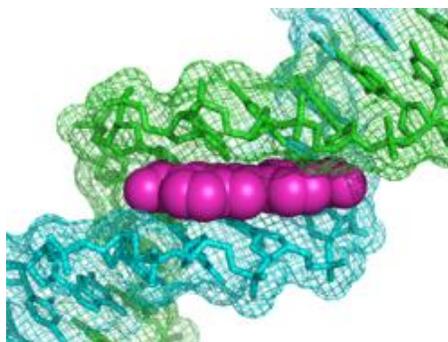


Fig. 20 Molecola di DAPI (viola) legata al solco minore della molecola di DNA (verde-blu). Immagine estratta dal sito PDB - Protein Data Bank.

Il DAPI lega anche l'RNA ma con un diverso modo di intercalarsi tra le basi quindi l'emissione risulta essere diversa.

La colorazione tramite DAPI è utilizzata per marcare i nuclei sia di cellule vitali che di cellule non vitali, essendo impermeabile alle membrane cellulari

Quando è legato al DNA, l'eccitazione massima corrisponde a 358 nm, mentre l'emissione massima a 461 nm (Fig.21), quindi emette nello spettro del blu.

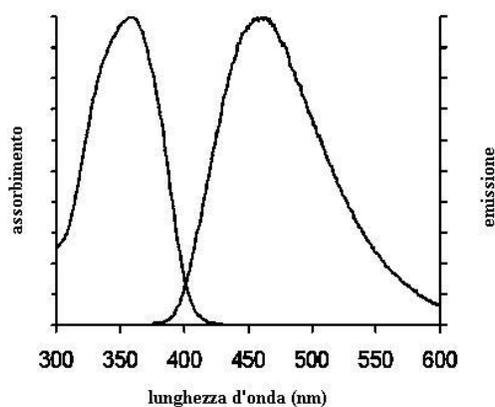


Fig. 21 Spettro di assorbimento e di emissione della molecola fluorescente di DAPI.

I vetrini sono stati colorati usando una soluzione di DAPI 300 nM ottenuta diluendo la soluzione stock (Invitrogen) con PBS. I preparati sono stati coperti con circa 100 μ l di soluzione diluita, lasciandoli ad incubare per circa 5 minuti. Dopo due tre lavaggi in PBS i campioni sono stati visualizzati al microscopio a fluorescenza usando appropriati filtri.

Valutazione della ritardanza del fuso meiotico di ovociti umani in seguito ad ICSI

Il poloscopio (Cambridge Research & Instrumentation, Inc. [Cri], USA) è stato utilizzato per verificare variazioni nei valori di ritardanza del fuso meiotico di 20 ovociti in seguito ad inseminazione. La ritardanza è stata misurata prima dell'inseminazione, e dopo l'ICSI ad intervalli regolari di 30 minuti fino alla fase iniziale di estrusione del secondo globulo polare.

Per analizzare il fuso ogni ovocita è stato posto in gocce di circa 10 μ l di terreno (COOK, Gamete Buffer) su di una piastra di vetro, le gocce sono state poi coperte completamente con olio. L'analisi al Poloscopio viene effettuata in condizioni di temperatura controllata (37°C) sia grazie a monitoraggi quotidiani delle superfici riscaldanti con termometri per superfici, sia grazie al controllo della temperatura interna delle gocce con termometro-sonda. Per ottimizzare la visualizzazione del fuso meiotico e del globulo polare gli ovociti venivano ruotati con l'aiuto della pipetta injecting usata per l'inseminazione. Il Poloscopio è accoppiato ad un software di processamento digitale dell'immagine (Fig.22) che permette di ricavare valori quantitativi di ritardanza del fuso meiotico come anche di altre strutture ordinate visibili attraverso questo sistema.



Fig. 22 Software di processamento digitale dell'immagine.

La ritardanza del fuso meiotico: è stata misurata utilizzando lo strumento immagine “*area*” che consente di circoscrivere la misurazione al fuso, ricoprendolo con una superficie ovale di pari grandezza (Fig.23).

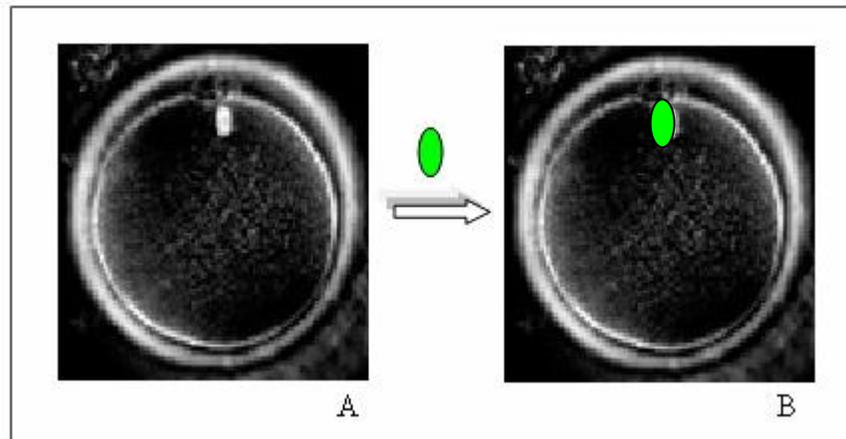


Fig. 23 La figura mostra come è possibile misurare la ritardanza del fuso meiotico con gli strumenti presenti all'interno del software: con lo strumento “*area*” (ovale verde) è possibile ricoprire il fuso meiotico per ricavarne la ritardanza (B).

RISULTATI

La presenza di DNA all'interno del primo globulo polare è stata verificata attraverso tecniche di colorazione in fluorescenza usando Propidio Ioduro (PI) e 4'.6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI).

Questo protocollo è stato eseguito sul primo globulo polare di 20 ovociti: 10 con alti valori di ritardanza del fuso meiotico, 10 con valori di ritardanza inferiori ai 2 nm, quindi realmente in metafase II, usati come controllo.

In tutti i globuli polari analizzati è stata rilevata la presenza di DNA. Può però essere fatta una considerazione: il DNA presente all'interno del primo globulo polare di ovociti con ritardanza elevata può essere valutato come DNA in frammentazione, rispetto alla colorazione osservata sui globuli polari degli ovociti utilizzati come controllo positivo.

La colorazione con DAPI e PI negli ovociti con ritardanza elevata mostra frammentazione della cromatina e i due tipi di colorazione coincidono dimostrando che legano le stesse strutture (Fig.24 A-B-C); invece nei globuli polari utilizzati come controllo la colorazione è più omogenea e non presenta frammentazione (Fig.24 D).

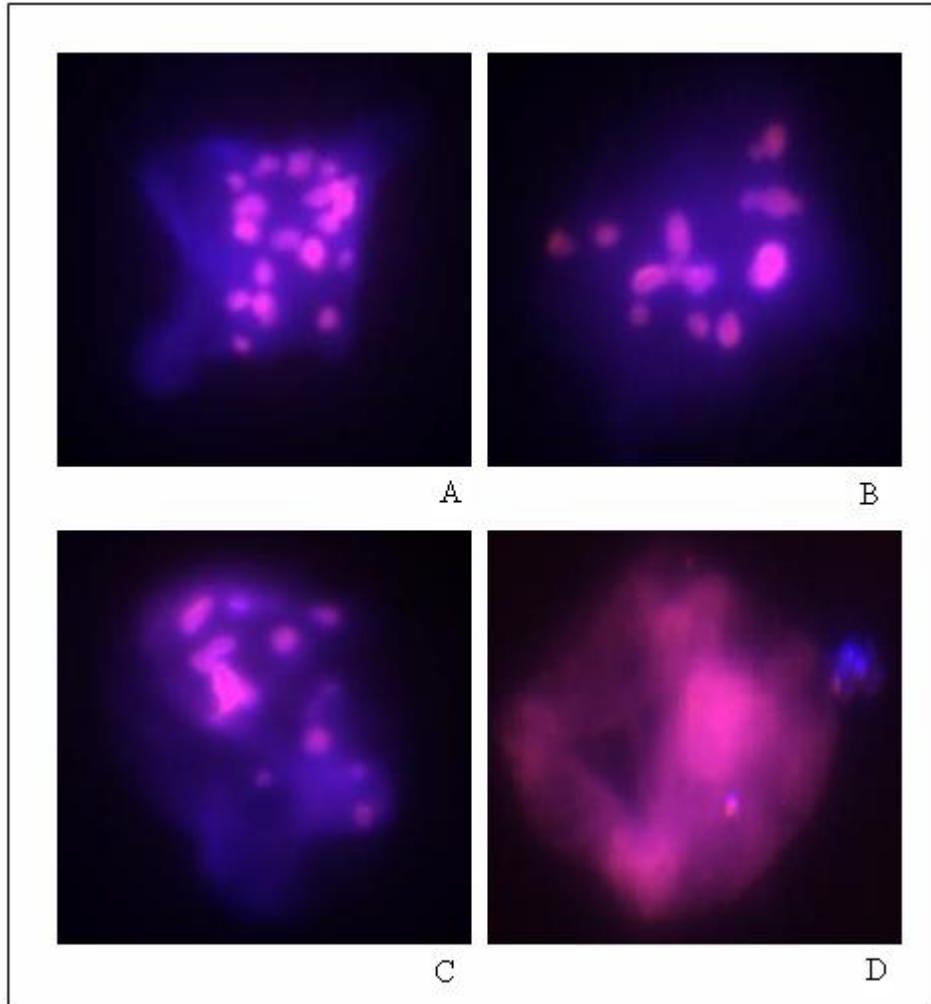


Fig. 24 Colorazione in fluorescenza tramite DAPI (blu) e Propidio Ioduro (rosso). Le foto A-B-C corrispondono a globuli polari che mostrano fuso con valori di ritardanza superiori ai 2 nm e rispettivamente di 2.51 nm (A), 2.26 nm (B) e 2.38 nm (C).

La foto D presenta il risultato della colorazione su di un globulo polare utilizzato come controllo con un valore di ritardanza pari a 1.51 nm.

Tutte le immagini mostrano la sovrapposizione delle due diverse colorazioni.

La seconda ipotesi invece è stata verificata indirettamente, valutando per prima cosa l'aumento di ritardanza del fuso meiotico nelle fasi successive all'inseminazione in 20 ovociti umani. Infatti gli studi presenti in letteratura sono pochi e interamente dedicati al topo come modello animale.

La ritardanza è stata misurata prima dell'inseminazione, e dopo la ICSI ad intervalli regolari di 30 minuti fino alla fase iniziale di estrusione del secondo globulo polare.

I valori di ritardanza del fuso meiotico precedenti all'inseminazione sono tutti compresi tra 1 e 2 nm. L'80% degli ovociti analizzati, quindi 16 su 20, mostrano variazioni nei valori di ritardanza con lo stesso andamento; 2 ovociti su 20 mostrano invece andamento discontinuo e i valori di ritardanza si mantengono sotto i 2 nm. I restanti 2 ovociti non arrivano all'estrusione del secondo globulo polare (Tab.9).

	Valori di ritardanza del fuso meiotico (nm)					
	0	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
1	1.55	1.11	1.75	2.01	2.36	
2	1.59	1.40	1.89	2.10	2.53	
3	1.34	1.29	1.63	1.89	2.26	2.78
4	1.71	1.53	1.66	2.33	2.74	2.97
5	1.82	1.96	2.21			
6	1.67	1.32	1.58	1.96	2.34	2.61
7	1.45	1.29	1.74	2.13	2.48	
8	1.61	1.33	2.14	2.57		
9	1.53	1.14	1.88	2.26	2.69	
10	1.38	1.21	1.59	2.03	2.57	
11	1.44	1.28	1.67	2.26		
12	1.22	0.99	1.39	1.97	2.11	
13	1.45	1.29	1.48	2.15	2.64	
14	1.71	1.22	1.64	2.03	2.58	2.91
15	1.58	1.33	1.60	2.19	2.63	
16	1.23	0.98	1.64	2.01	2.84	
17	1.51	1.23	1.45	1.15	1.66	
18	1.58	1.27	1.61	1.38	1.78	
Ovociti che non arrivano ad estrarre il secondo globulo polare						
19	1.55	1.32	1.48	1.89	1.23	1.42
20	1.69	1.57	1.45	1.80	1.33	1.44

Tab. 9 La tabella mostra le variazioni dei valori di ritardanza del fuso meiotico misurati prima dell'inseminazione (tempo 0) e dopo l'inseminazione, ad intervalli regolari di 30 minuti fino alla iniziale estrusione del secondo globulo polare. Solamente gli ovociti numero 19 e 20 non hanno mostrato l'estrusione del secondo globulo polare.

Considerando solo i primi diciotto ovociti, possiamo osservare che la soglia dei 2 nm viene superata dalla maggior parte degli ovociti (11 su 18) dopo 90 minuti, da 3 ovociti a 120 minuti, da 2 ovociti a 60 minuti mentre 2 su 18 ovociti non superano i 2 nm. L'estrusione del secondo globulo polare inizia per 11 ovociti su 18 a 120 minuti, per 4 ovociti a 150 minuti, per 2 ovociti a 90 minuti, per 1 ovocita a 60 minuti.

Andando ad analizzare il cambiamento di ritardanza del fuso meiotico nel tempo si può notare che nei primi 16 ovociti la ritardanza subisce un iniziale calo rispetto al valore misurato prima dell'ICSI, poi la curva tende a salire fino ad arrivare ad un punto massimo, superiore ai 2 nm, in corrispondenza dell'iniziale estrusione del secondo globulo polare. La ritardanza degli ultimi 2 ovociti ha invece andamento discontinuo e non supera i 2 nm (Grafico 1).

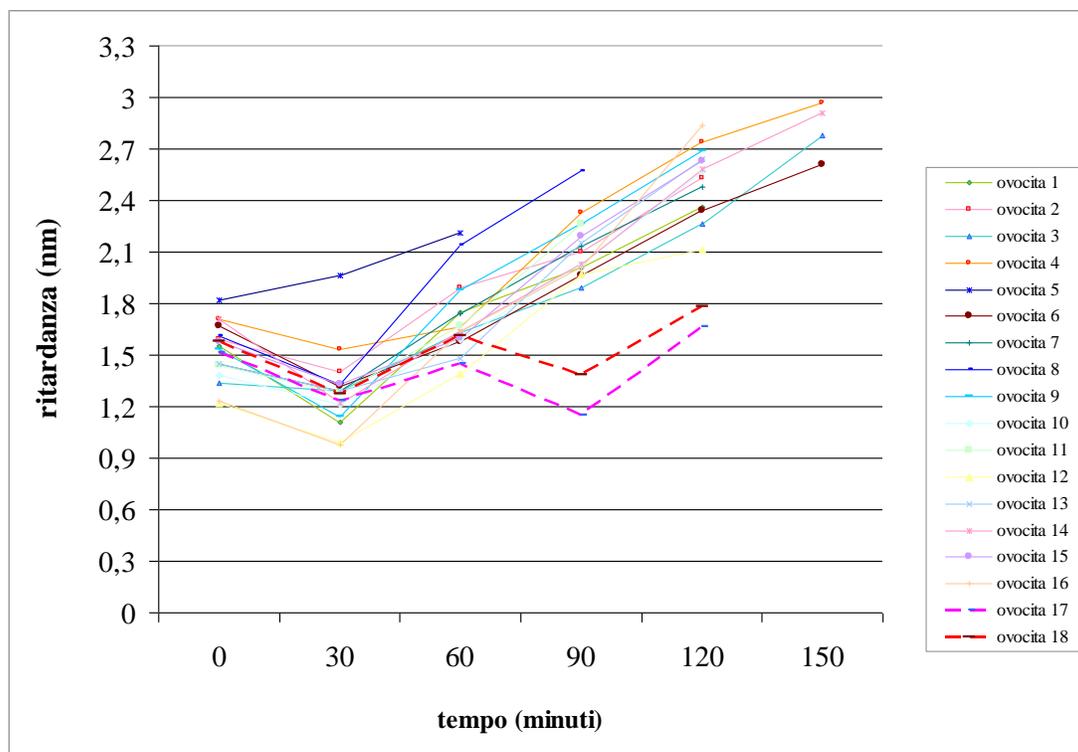


Grafico 1 Il grafico mostra la variazione dei valori di ritardanza del fuso meiotico in seguito ad inseminazione tramite ICSI.

Al punto 0 corrisponde la misura della ritardanza prima dell'inseminazione. Dopo l'ICSI le misure sono state effettuate attraverso il Poloscopio ogni 30 minuti fino all'iniziale estrusione del secondo globulo polare.

Dal punto di vista qualitativo la variazione di ritardanza è stata osservata attraverso il Poloscopio come aumento della luminosità del fuso meiotico (Fig.25).

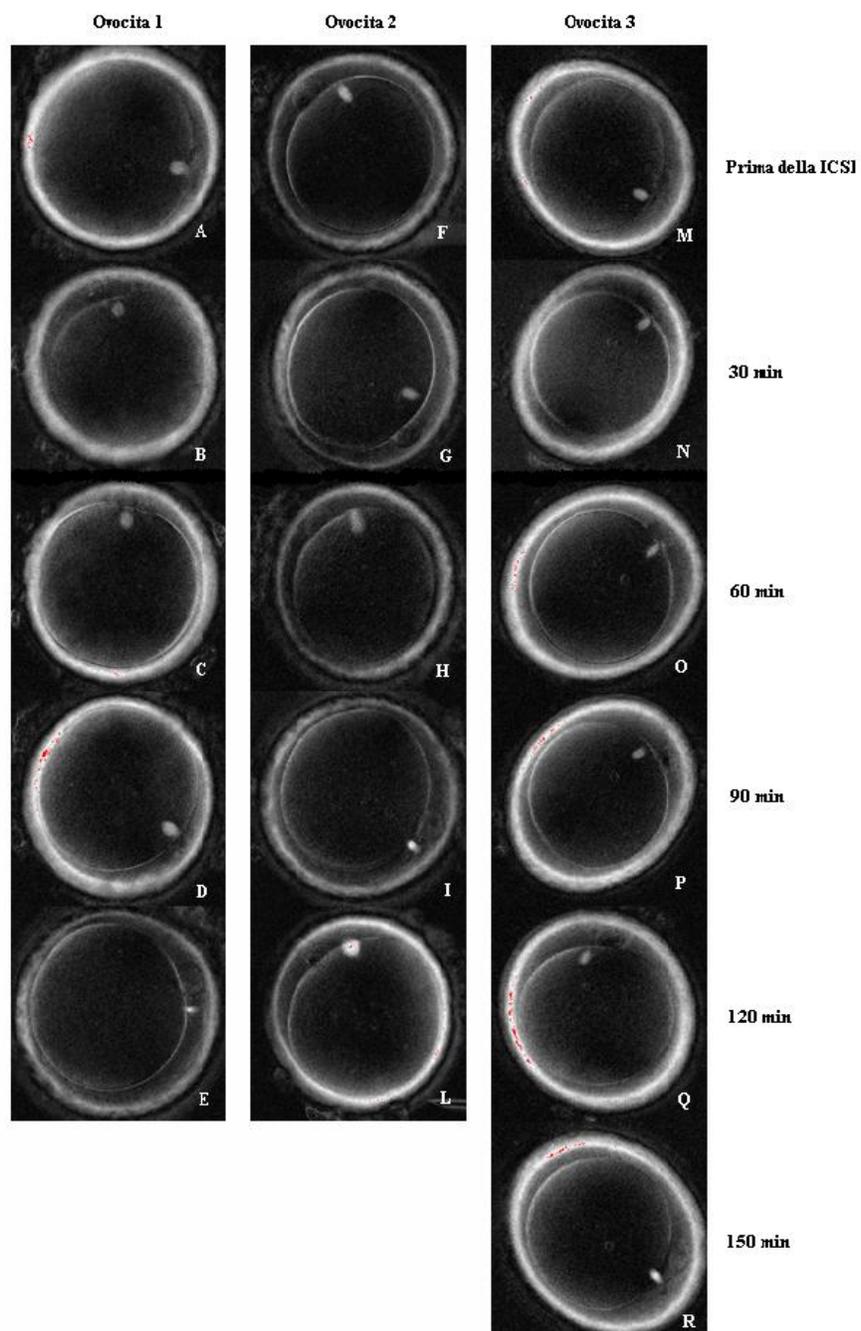


Fig. 25 La figura mostra la variazione qualitativa di ritardanza del fuso meiotico di tre ovociti dal momento precedente all'inseminazione (A-F-M) fino all'iniziale estrusione del secondo globulo polare (E-L-R). I valori di ritardanza sono riportati nella tabella 8 e corrispondono agli ovociti 1, 2, e 3.

DISCUSSIONE

Come in ogni disegno sperimentale si parte dalle osservazioni e si elaborano delle ipotesi che successivamente vanno verificate con opportuni esperimenti.

I risultati ottenuti possono confermare la nostra tesi oppure possono smentirla, in quel caso è necessario tornare al principio ed elaborare una nuova ipotesi.

Lo studio di questa tesi parte dall'osservazione che ovociti con valori di ritardanza superiori ai 2 nm, quando inseminati, nella maggior parte dei casi portano a degenerazione o a fertilizzazioni anomale, e non allo sviluppo di embrioni di buona qualità così come affermato da alcuni studi presenti in letteratura (Shen et al. 2006; Rama et al. 2007).

Questo risultato ha portato ad elaborare due ipotesi.

La prima prende in considerazione la possibilità che in realtà gli ovociti sottoposti ad ICSI con valori di ritardanza superiori ai 2 nm, che hanno mostrato degenerazione o fertilizzazioni anomale, non fossero cellule in metafase II ma in realtà cellule in metafase I con la presenza di un globulo polare nello spazio perivitellino, probabilmente privo di materiale genetico. In questo caso la degenerazione e le fertilizzazioni anomale potrebbero essere spiegate con il fatto che l'inseminazione fosse stata eseguita su cellule con un corredo cromosomico ancora $4n$.

La seconda ipotesi invece prende in considerazione l'evento opposto, cioè che questi particolari ovociti siano stati attivati precocemente tramite un meccanismo partenogenico, indipendente dall'incontro con lo spermatozoo, che li ha portati ad uno stadio maturativo più avanzato e quindi non idoneo all'inseminazione.

La presenza di DNA all'interno del globulo polare è stata verificata attraverso tecniche di colorazione in fluorescenza usando Propidio Ioduro (PI) e 4'.6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI).

I risultati di questa analisi portano ad escludere la prima ipotesi perché in tutti i globuli polari analizzati è stata rilevata la presenza di DNA.

In realtà questo era parzialmente prevedibile in quanto la formazione del globulo polare presuppone la presenza di materiale genetico: durante l'anafase i cromosomi si separano posizionandosi ai poli opposti e durante la telofase attorno ad ogni serie di cromosomi si riforma l'involucro nucleare ed il citoplasma si divide (citocinesi).

Può però essere fatta una considerazione, il DNA presente all'interno del primo globulo polare di ovociti con ritardanza elevata può essere valutato come DNA in frammentazione, rispetto alla colorazione osservata sui globuli polari degli ovociti utilizzati come controllo e quindi con ritardanza inferiore ai 2 nm.

Non ci sono studi in letteratura che abbiano tentato di dimostrare nell'uomo quale possa essere il destino dei due globuli polari, l'unico studio su cui è possibile basarsi riguarda una ricerca eseguita su ovociti di topo come modello animale (Bartholomeusz et al. 2003). Nel topo il primo globulo polare scompare in breve tempo dopo la fecondazione attraverso un meccanismo di morte cellulare per necrosi, molto probabilmente invece il secondo globulo polare subisce un meccanismo apoptotico. Come si può vedere dall'immagine (Fig.26) il Propidio Ioduro, che come abbiamo visto colora solamente le cellule morte, penetra nel primo globulo polare ma non nel secondo, forse perché il primo sta già andando incontro a degenerazione e ha perso la normale permeabilità di membrana.



Fig. 26 Immagine a fluorescenza di un ovocita di topo che appena estruso il secondo globulo polare. Il Propidio Ioduro (rosa) è penetrato soltanto nel primo globulo polare, indicando uno stadio necrotico, mentre l'ovocita e il secondo globulo polare risultano blu per la colorazione attraverso Hoechst, che è permeabile alle membrane cellulari (Bartholomeusz et al. 2003).

L'obiettivo di questa tesi non è quello di dimostrare quale sia il destino del primo globulo polare e non essendoci studi precedenti su ovociti umani non possiamo nemmeno trarre delle conclusioni certe, possiamo però affermare di aver osservato, attraverso la colorazione in fluorescenza con DAPI e Propidio Ioduro, DNA in frammentazione all'interno del primo globulo polare di ovociti con ritardanza del fuso meiotico superiore ai 2 nm.

Quale sia il meccanismo che porta alla frammentazione del DNA nel primo globulo polare in ovociti umani è ancora da chiarire: potrebbe essere dovuto a necrosi, così come ipotizzato da Bartholomeusz nel topo, come risultato della perdita di integrità delle membrane, ma non possiamo escludere il meccanismo apoptotico come responsabile della morte programmata del primo globulo polare.

Nonostante questo la presenza di materiale genetico in frammentazione può avvalorare ulteriormente la seconda ipotesi, potendo spiegare la presenza di DNA

degenerato con il fatto che questi ovociti possano essere stati attivati precocemente con un meccanismo partenogenico, quindi indipendente dallo spermatozoo, portandoli ad uno stadio maturativo avanzato.

Ulteriori dati a favore della seconda ipotesi sono stati ricavati valutando l'aumento di ritardanza del fuso meiotico, nelle fasi successive all'inseminazione tramite ICSI, in 20 ovociti umani. Infatti in letteratura sono presenti alcuni studi, sempre basati sul modello animale, che dimostrano, attraverso l'utilizzo del Poloscopio, questa crescita nei valori di ritardanza.

Uno di questi lavori (Liu et al. 2000b) mette in evidenza la variazione di ritardanza e le modificazioni morfologiche che l'ovocita e il fuso subiscono in seguito ad attivazione, in questo caso ottenuta artificialmente attraverso meccanismi partenogenici con l'utilizzo di calcio, messaggero essenziale nella cascata di eventi che portano all'attivazione ovocitaria e alla conclusione degli eventi di fecondazione. L'attivazione partenogenica degli ovociti trattati con calcio provoca un aumento dinamico nella ritardanza del fuso meiotico, specialmente nella regione mediana, che si mantiene fino all'estrusione del secondo globulo polare. La variazione dei valori di ritardanza del fuso meiotico in seguito ad attivazione è stata per la prima volta indagata con questo lavoro sperimentale.

Inoltre questo studio dimostra attraverso l'utilizzo del Poloscopio che la ritardanza del fuso meiotico di ovociti fertilizzati è maggiore della ritardanza riscontrata in ovociti in metafase II, sia qualitativamente (Fig.27) che quantitativamente (Tab.10).

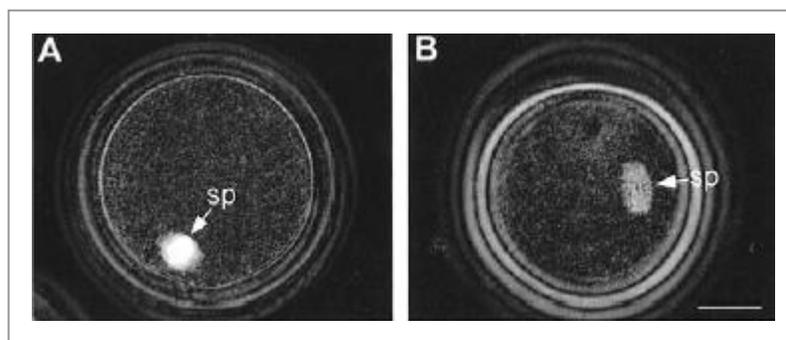


Fig. 27 Le due immagini mettono a confronto la ritardanza ottenuta attraverso l'analisi al Poloscopio di un ovocita fertilizzato (A) e di un ovocita in metafase II (B) (Liu et al. 2000b).

sp = spinale

		Ritardanza fuso meiotico (nm)	
		Media \pm DS	
ovociti	numero	Ritardanza fuso intero	Ritardanza regione mediana
Fertilizzati	7	2.20 \pm 0.34	3.12 \pm 0.39
MII	17	1.52 \pm 0.18	1.51 \pm 0.19

Tab. 10 La tabella mette a confronto i valori di ritardanza del fuso meiotico in ovociti fertilizzati e in ovociti in metafase II (Liu et al. 2000b).

Leggendo questi risultati e prendendo in considerazione le osservazioni che derivano dal lavoro sperimentale di questa tesi, nasce spontanea la seguente domanda: l'aumento di ritardanza del fuso meiotico nelle fasi successive all'attivazione dell'ovocita si ha anche nell'uomo?

Ed è proprio questo che è stato indagato misurando i cambiamenti nei valori di ritardanza da prima dell'inseminazione, fino all'estrusione del secondo globulo polare.

Esattamente come è stato dimostrato nel topo, anche nell'uomo possiamo indicare in base ai nostri risultati un aumento di ritardanza del fuso meiotico nelle fasi successive all'inseminazione, fino ad arrivare ad un punto massimo in corrispondenza della iniziale estrusione del secondo globulo polare.

Cosa porti a questo aumento non è ancora chiaro, i fattori possono essere molteplici. Ad esempio potrebbe essere dovuto ad un aumento di densità dei microtubuli che compongono il fuso meiotico, o alla formazione dell'anello necessario per la citocinesi composto da filamenti di actina, struttura birifrangente che circonda la regione mediana del fuso durante le fasi iniziali dell'attivazione e durante l'estrusione del globulo polare, o ancora alla sovrapposizione dei microtubuli polari soprattutto a livello della regione equatoriale del fuso meiotico durante i primi stadi dell'anafase.

Quindi alti valori di ritardanza del fuso meiotico valutabili attraverso l'uso del Poloscopio, potrebbero rappresentare un indicatore efficace di attivazione ovocitaria precoce.

CONCLUSIONI

I nostri risultati, oltre a mettere in discussione i dati presenti in letteratura (Shen et al. 2006; Rama et al. 2007), aprono un nuovo campo di indagine nella definizione di maturità ovocitaria, perché non è più sufficiente valutare la presenza del primo globulo polare estruso per definire una cellula in metafase II., è invece necessaria un'accurata analisi quantitativa del fuso meiotico valutando la sua ritardanza.

Avendo riscontrato la presenza di DNA attraverso la colorazione in fluorescenza con DAPI e Propidio Ioduro all'interno dei globuli polari di ovociti con valori di ritardanza superiori ai 2 nm, possiamo escludere la formazione di un globulo polare fittizio privo di materiale genetico.

Invece sia la presenza di DNA degenerato all'interno del primo globulo polare di ovociti con alti valori di ritardanza, sia l'aumento di rifrangenza del fuso meiotico negli stadi successivi all'inseminazione, sembrano supportare la possibilità di una attivazione precoce di questi ovociti probabilmente attraverso meccanismi partenogenici. Infatti, mentre la Meiosi I rappresenta una sequenza di eventi standardizzati e regolati da eventi interni alla cellula, la Meiosi II dipende sia da meccanismi intracellulari che dall'incontro dell'ovocita con lo spermatozoo quindi, essendo soggetta a più variabili, è proprio questa seconda fase che ha più probabilità di subire variazioni dal suo normale svolgimento.

Questa probabilità aumenta ulteriormente nelle tecniche di fecondazione assistita dove la coltura degli ovociti e la loro fertilizzazione è strettamente dipendente da parametri sia fisici che chimici la cui variazione può indurre l'attivazione spontanea della cellula (Whittingham et al. 1980). E' necessario però sottolineare che in un laboratorio di fecondazione assistita queste variabili sono altamente controllate quindi probabilmente la causa di questa attivazione precoce va ricercata all'interno dell'ovocita, a partire dall'analisi del suo genoma .

Nonostante queste osservazioni la conclusione di questa tesi non può essere certa in quanto i dati a nostra disposizione sono pochi per poter trarre delle conclusioni, e non rinforzano nemmeno risultati ottenuti da studi precedenti, in quanto i pochi lavori presenti in letteratura sono stati eseguiti sul topo come modello animale.

Comunque questa analisi sperimentale mette in evidenza l'importanza del Poloscopio come strumento indispensabile in un laboratorio di fecondazione assistita per l'analisi sia qualitativa che quantitativa di strutture come il fuso meiotico o la zona pellucida e inoltre apre nuovi campi di indagine. Infatti gli obiettivi futuri saranno: approfondire questa ricerca con la raccolta di un numero più considerevole di dati, definire i valori

ottimali di ritardanza del fuso meiotico e utilizzare anche altri parametri quantitativi come la lunghezza del fuso o la ritardanza e lo spessore della zona pellucida per selezionare con alta probabilità gli ovociti migliori per ogni paziente.

BIBLIOGRAFIA

1. Balaban B, Urman B, Sertac A et al. 1998 *Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection* Hum. Reprod. 12:3431–3433
2. Bartholomeusz R, 2003 *Review of the longevity of the second polar body in the mouse* Zygote 11:23-34
3. Battaglia DG, Goodwin P, Klein A et al. 1996 *Influence of maternal age on meiotic spindle in oocytes from naturally cycling woman* Hum. Reprod. 11:2217-22
4. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C et al. 1996 *Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection* Hum. Reprod. 1996 11(3):595-7
5. Ebner T, Moser M, Yaman C et al. 1999 *Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy* Fertil Steril. 72(4):599-603
6. Ebner T, Yaman C., Moser M. et al. 2000 *Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection* Hum. Reprod. 15:427-430
7. Ebner T, Moser M, Sommergruber M et al. 2002 *First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients* Hum. Reprod. 17(9):2415-8
8. Inouè S, 1953 *Polarization optical studies of the mitotic spindle. The demonstration of spindle fibers in living cells* Chromosoma 5:487-500
9. Keefe D, Tran P, Pellegrini C 1997 *Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida* Hum. Reprod. 12:1250-2
10. Liu L, Oldenbourg R, Trimarchi JR 2000a *A reliable, non-invasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes.* Nat Biotechnol 18:223-225
11. Liu L, Trimarchi JR, Oldenbourg R, Keefe LD 2000b *Increased birefringence in the meiotic spindle provides a new marker for the onset of activation in living human oocyte* Biology of Reproduction 63:251-258
12. Moon JH, Hyun CS, Lee SW et al. 2003 *Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the PolScope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI* Hum. Reprod. 18:187–820

13. Navarro P, Liu L, Trimarchi J et al. 2005 *Noninvasive imaging of spindle dynamics during mammalian oocyte activation* Fertility and Sterility 83:1197–1205
14. Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM et al. 2007 *Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging* Reprod Biomed Online. 14(2):166–74
15. Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F et al. 2003 Relationship between meiotic spindle location with regard to the polar body position and oocyte developmental potential after ICSI Hum. Reprod. 18:1289–1293
16. Sato H, Ellis GW, Inouè S et al. 1975 *Microtubular origin of meiotic spindle from birefringence. Demonstration of the applicability of Wiener's equation* Journal of Cell Biology 67:501-517
17. Serhal P, Rainer D, Kinis A et al. 1997 *Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection* Hum. Reprod. 12:1267–1270
18. Shen Y, Stalf T, Mehnert C et al. 2006 *Light retardance by human oocyte spindle is positively related to pronuclear score after ICSI* Reproductive BioMedicine Online 12:737–751
19. Wang WH, Meng L, Hackett RJ et al. 2001a *Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination* Hum. Reprod. 16(7):1464-8
20. Wang WH, Meng L, Hackett RJ et al. 2001b *Limited recovery of meiotic spindle in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy* Hum. Reprod. 16(11):2374-8
21. Wang W, Meng L, Hackett RJ et al. 2001c *The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes* Fertility and Sterility 75:348–353
22. Whittingham D.G. 1980 *Parthenogenesis in mammals* Oxford Reviews in Reproductive Biology, Oxford University Press 205–231
23. Xia P 1997 *Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality* Hum. Reprod. 12:1750–1755
- 24.** Legge 19 febbraio 2004 n. 40 pubblicata nella Gazzetta Ufficiale n. 45 del 24 febbraio 2004