



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia

Curriculum Biomedico e Biomolecolare

**“COLTURA EMBRIONARIA IN PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA
CON L'USO DI TERRENI SEQUENZIALI O DI TERRENO CONTINUO: ANALISI
COMPARATIVA DELLA QUALITÀ DELLE BLASTOCISTI OTTENUTE”**

Candidata:

Valentina Bartolotti
Valentina Bartolotti

Relatore:

Prof. Elia Ranzato
Elia Ranzato

Stage svolto presso ASL CN1

Tutor esterno: Dr.ssa Debora Di Simone

Responsabile Ente: Dr.ssa Grazia Maria Alberico

Anno Accademico 2022/2023

Indice

Abstract	3
Introduzione	4
Gametogenesi femminile	8
Gametogenesi maschile	10
Meccanismi fisiologici della fecondazione	11
Tecniche di PMA	13
Terreni di coltura embrionaria	22
Scopo del lavoro	25
Materiali e Metodi	26
Risultati ed elaborazione dati	29
Discussione e Conclusioni	33
Bibliografia	35
Sitografia	36

Abstract

L'infertilità è definita dall'OMS come l'assenza di concepimento dopo 12 mesi o più di regolari rapporti sessuali mirati non protetti.

Nel mondo circa il 17,5% della popolazione soffre di infertilità e nell'ultimo report dell'Istituto Superiore di Sanità, relativo all'attività dei Centri di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA), viene stimata un'incidenza del 15% nelle coppie italiane.

Le cause sono molteplici, in linea di massima, sono riconducibili per circa la metà dei casi a problemi dell'apparato riproduttivo femminile e nell'altra metà dei casi l'infertilità è di tipo maschile. Una delle principali cause che attualmente viene evidenziata nella popolazione italiana, ma in genere anche in tutti i paesi industrializzati, è la ricerca della genitorialità in età relativamente avanzata, con età femminile maggiore di 37 anni.

Per risolvere le problematiche dell'infertilità si ricorre alle tecniche di PMA che possono essere divise, in base alla loro complessità, in tecniche di primo, secondo e terzo livello. Le tecniche di primo livello sono tecniche in vivo meno invasive, mentre per le tecniche di secondo e terzo livello la fecondazione avviene in vitro, è necessaria la coltura di gameti ed embrioni e la qualità dei terreni di coltura è fondamentale per raggiungere buone performance.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di confrontare due tipi di coltura embrionaria, basata su due filosofie differenti: una coltura con l'uso di terreni sequenziali, che si rifà alla concezione del *"back to nature"* ed una coltura con terreno singolo, incentrata sulla concezione del *"let the embryo choose"*.

Nello studio è stata valutata la qualità delle blastocisti ed il numero di gravidanze ottenute in due gruppi di donne, indirizzate casualmente verso un tipo o l'altro di tecnica colturale.

Le due popolazioni sono state scelte in modo da avere due gruppi omogenei per età, numero di ovociti prelevati e numero di zigoti ottenuti.

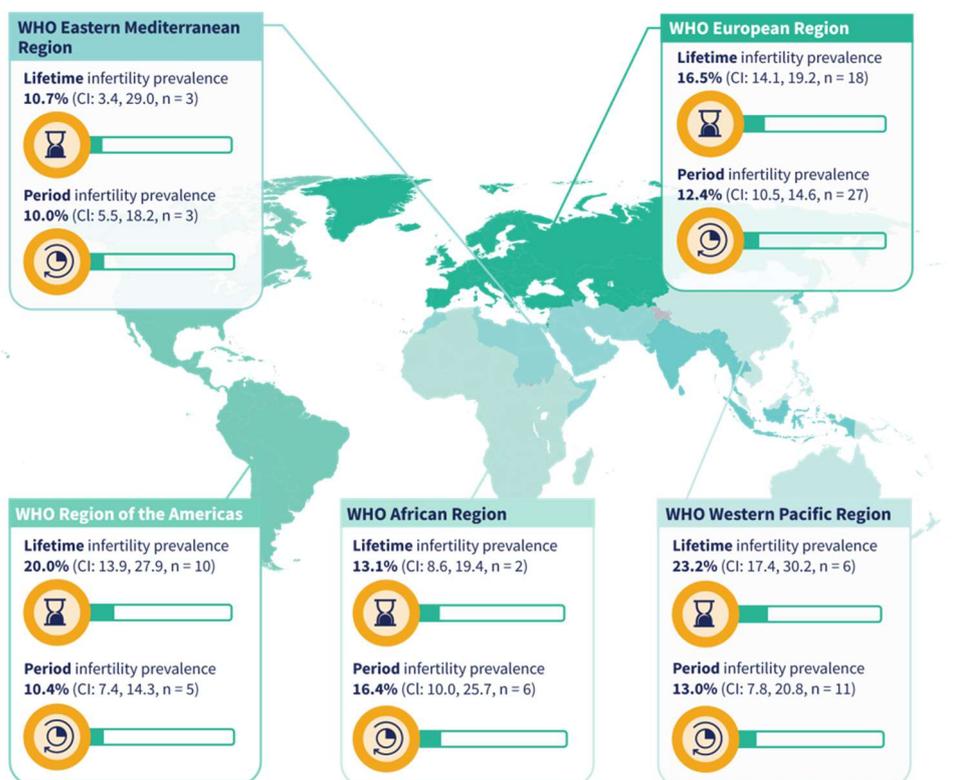
Dall'analisi statistica che abbiamo effettuato non è risultata una differenza significativa, nelle due tecniche colturali, sia per quanto riguarda il raggiungimento della gravidanza sia per l'ottenimento di blastocisti di buona qualità.

Introduzione

L'infertilità è una condizione che colpisce moltissime persone in tutto il mondo, è definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), come l'assenza di concepimento dopo 12 mesi o più di regolari rapporti sessuali mirati non protetti e può riconoscere molteplici cause sia di natura maschile che femminile (19). Si parla di infertilità primaria quando non si è mai avuta una gravidanza, mentre la condizione di infertilità secondaria si verifica quando, in precedenza, è stata raggiunta almeno una gravidanza (21).

Secondo i dati pubblicati dall'OMS nel 2023, nel report *Infertility prevalence estimates 1990 - 2021*, circa il 17,5% della popolazione mondiale soffre di infertilità, con una variazione limitata nella prevalenza tra le varie parti del mondo: si passa dal 17,8% nei paesi ad alto reddito, al 16,5% nei paesi a basso e medio reddito. Di conseguenza almeno 1 persona su 6 nel mondo soffre o ha sofferto di infertilità nel corso della sua vita (19).

Figura 1: Prevalenza dell'infertilità nelle varie regioni del Mondo (tratto da WHO, 2023 *Infertility prevalence estimates 1990 -2021*)

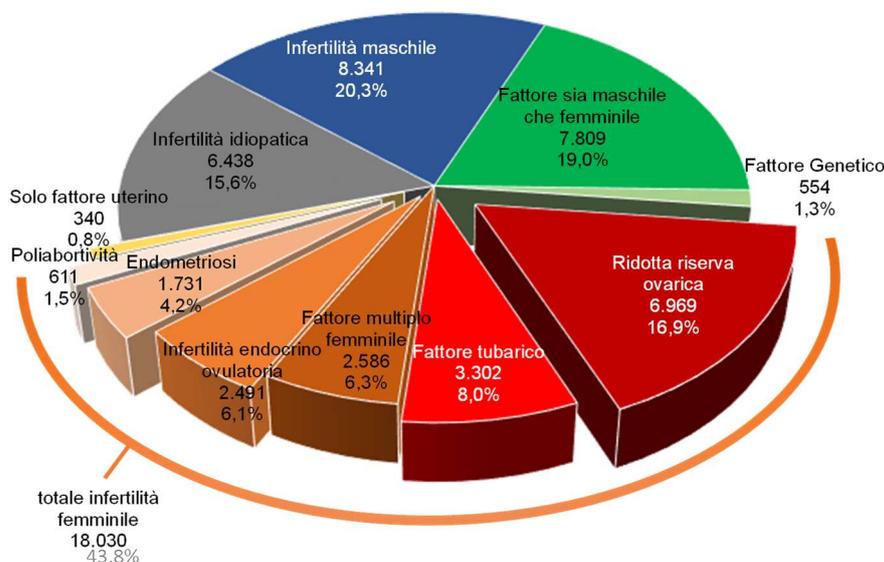


In Italia si stima che circa il 15% delle coppie soffrono di sterilità ma i dati sia italiani che mondiali sono molto probabilmente sottostimati (18). Ad oggi sono pochi gli studi sulla prevalenza dell'infertilità nella popolazione, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, inoltre anche nei paesi industrializzati la letteratura sull'argomento si basa su lavori scientifici prodotti dai centri di PMA (5). Questi dati dunque si riferiscono ad una popolazione selezionata e rimangono completamente sconosciute le coppie che non si rivolgono a tali centri.

Il problema dell'infertilità rimane un argomento controverso, molte organizzazioni internazionali che hanno come scopo la risoluzione dei problemi di salute pubblica globale non considerano l'infertilità come una priorità, fa eccezione l'OMS. Questa poca considerazione della salute riproduttiva è probabilmente da ricercare nel problema demografico della sovrappopolazione mondiale. Soprattutto in paesi come l'Africa sub-sahariana, in cui sono riportati tassi di infertilità che si aggirano intorno al 16% della popolazione, la ridotta fertilità è vista quasi come un modo per controllare la crescita demografica (5).

Le cause che portano all'infertilità sono molteplici; in Italia, in base ai dati pubblicati nell'ultimo Report dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) circa l'attività dei centri PMA nel 2021, le cause del mancato concepimento riconducibili a soli problemi di salute femminile riguardano il 43,8% dei casi, nel 20,3% l'infertilità è solo maschile, nel 19% si riconoscono problemi sia femminili che maschili, nell'1,3% influiscono fattori genetici ed infine nel 15,6% dei casi non si riesce ad individuare nessuna causa, si parla di infertilità idiopatica (18).

Figura 2: Cause di Infertilità in Italia (tratto da 17° Report, 2023 *Attività del Registro Nazionale Italiano della Procreazione Medicalmente Assistita, Attività 2021*)



Tra le cause di infertilità femminile quella segnalata più frequentemente (16,9% dei casi) è la ridotta riserva ovarica, questo può avvenire per cause congenite, mediche (ad esempio uso di chemioterapici o altri farmaci gonadotossici in età fertile), chirurgiche o per età avanzata.

Tra le altre cause particolarmente rilevanti sono i danni alle tube di Falloppio, conseguenti ad esempio a pregresse infezioni (come quelle dovute a *Chlamydia*) che rendono difficile o impossibile sia la fertilizzazione dell'ovocita che l'arrivo dell'ovocita fertilizzato nell'utero.

Meno frequenti sono le altre cause di sterilità femminile:

- Fattori endocrini ovulatori come ad esempio la sindrome dell'ovaio policistico.
- Endometriosi che è una patologia caratterizzata dalla presenza di endometrio in posizione anomala. Questa condizione determina una ridotta qualità ovocitaria, un'alterazione del liquido follicolare che inficia la capacità dello spermatozoo di fertilizzare l'ovocita e infine una ridotta possibilità di impianto dell'embrione.
- Alterazioni anatomiche dell'utero (malformazioni congenite o acquisite) oppure fattori infiammatori a carico dell'endometrio.
- Poliabortività quando si sono verificati due o più aborti spontanei senza alcuna gravidanza a termine.
- Fattore multiplo femminile quando più cause di infertilità femminile vengono diagnosticate contemporaneamente.

L'infertilità maschile è definita come la condizione in cui si ha un basso numero di spermatozoi sani o quando si hanno problemi con la funzionalità spermatica tali da rendere difficile la fertilizzazione dell'ovocita in condizioni normali (22).

Nella maggior parte dei casi questa situazione si verifica in presenza di:

- Varicocele, caratterizzato da una dilatazione varicosa delle vene dello scroto che provoca un aumento della temperatura del testicolo, in grado di interferire con la produzione di spermatozoi che sono molto sensibili al calore. La temperatura ottimale per una buona gametogenesi deve mantenersi intorno ai 35 °C.
- Criptorchidismo, in cui si ha la mancata o incompleta discesa dei testicoli nello scroto; questo difetto congenito è la più frequente malformazione maschile con una prevalenza del 2-4% nei nati a termine. Se la correzione non avviene precocemente in età pediatrica si verifica un danno irreversibile a carico degli spermatogoni.

- Infezioni cronicizzate, che possono causare il restringimento parziale o totale dei dotti deferenti, necessari per il trasporto del liquido seminale dai testicoli fino al pene. Si ha in questi casi una azoospermia (assenza di spermatozoi nel liquido seminale) di tipo ostruttivo.
- Insufficienza ormonale, con una minore produzione di spermatozoi (ipogonadismo)
- Anomalie genetiche, che causano una scarsa o nulla produzione di spermatozoi, in particolare la microdelezione del cromosoma Y.
- Fattori immunologici, dovuti alla produzione di anticorpi anti-spermatozoo che può aver luogo, ad esempio, in seguito a traumi del testicolo. Il testicolo è uno dei “santuari” inaccessibili al sistema immunitario grazie alla barriera emato-testicolare; quando per qualsiasi causa gli antigeni testicolari entrano in contatto con cellule immunitarie vengono prodotti autoanticorpi che inficiano la funzione fertilizzante degli spermatozoi. Anche l'organismo femminile può produrre anticorpi anti-spermatozoo, questi possono attaccare gli spermatozoi non appena entrano in contatto con il muco cervicale impedendo la fecondazione.

I fattori genetici sono tra i fattori meno frequenti di infertilità e possono essere sia maschili che femminili. Rientrano in questa categoria alterazioni cromosomiche come ad esempio la sindrome di Klinefelter (47 XXY), la sindrome di Turner (X0), la sindrome dell’X fragile, condizioni di mosaicismo di queste affezioni, la già nominata condizione di microdelezioni del cromosoma Y, la fibrosi cistica ecc. (8) (18).

A volte può capitare che si verifichi una incompatibilità di coppia, sono casi in cui i partner risultano o sono risultati fertili con altri compagni ma sterili con i partner attuali (20).

La letteratura scientifica negli ultimi anni ha messo in risalto come siano sempre più influenti, nella difficoltà riproduttiva, fattori psico-sociali relativi allo stile di vita, come ad esempio, la ricerca del primo figlio in un’età della donna in cui la fertilità è fisiologicamente in declino, l'uso di droghe, l'abuso di alcool, il fumo, le condizioni lavorative e l'inquinamento (20).

Il periodo più fertile per una donna è tra i 20 e i 25 anni, resta sufficientemente alto fino ai 35 ma subisce un considerevole calo dai 35 ai 40 anni, periodo in cui c’è solo il 20% di probabilità di avere una gravidanza; è bassissima oltre i 40, in cui questa probabilità scende al 5-7%. Con l'età, infatti, invecchiano i gameti femminili e aumenta il rischio di malattie connesse alla infertilità-sterilità. L'età dell'uomo è molto meno significativa, tuttavia uomini in età avanzata hanno un eiaculato peggiore sia in termini qualitativi che quantitativi (18).

La genitorialità rimandata è attribuibile in parte all' emancipazione femminile avvenuta dalla metà del secolo scorso. Le donne che erano prima relegate ad un ruolo di casalinghe e madri hanno visto nell' ultimo secolo cambiare totalmente, almeno nel mondo occidentale, il loro ruolo sociale. L' accesso all' istruzione superiore e al mondo del lavoro ha determinato la ricerca di una propria realizzazione personale procrastinando dunque il concepimento. Inoltre negli anni si è rafforzata l' idea di una genitorialità programmata e soprattutto desiderata dove il figlio viene ricercato solo a seguito di una certa stabilità economica. La ricerca di un figlio in età sempre più tardiva cozza inevitabilmente con i tempi fisiologici dell' organismo determinando un aumento dei casi di infertilità.

Gametogenesi femminile

La gametogenesi femminile detta anche oogenesi è il processo alla base della produzione delle cellule uovo, la maturazione dei follicoli è definita invece follicologenesi.

La gametogenesi femminile ha un andamento ciclico e permane per tutta la fase fertile della donna, dal primo menarca fino alla menopausa.

L' oogenesi è divisa in due fasi: la differenziazione degli ovociti che avviene durante la vita embrionale e lo sviluppo degli ovociti che avviene in post-pubertà.

Durante la vita embrionale, nelle prime settimane dopo il concepimento, le cellule germinali primordiali, sotto lo stimolo di proteine morfogenetiche (BMP2, BMP8b e BMP4), migrano verso la cresta genitale, proliferano per mitosi e danno origine agli ovogoni; parte di essi poi vanno incontro al processo di auxocitosi trasformandosi in ovociti primari (14).

Gli ovociti primari, intorno alla tredicesima settimana di vita embrionaria, vanno incontro alla prima divisione meiotica che si arresta nella profase I. Gli ovociti bloccati in questo stadio sono circondati da un singolo strato appiattito di cellule somatiche che costituiscono le cellule della granulosa. Queste strutture chiamate follicoli primordiali rappresentano in tutti i mammiferi, l' unica fonte di produzione di cellule uovo nella vita adulta. Il numero di cellule germinali raggiunge un picco massimo di 6-7 milioni durante il quinto mese di gestazione ma questo numero subisce un drammatico declino tale per cui il numero di follicoli primordiali si aggira intorno a 1-2 milioni alla nascita e si riduce ulteriormente a circa 250.000 al momento della pubertà (3) (13).

I follicoli primordiali dalla pubertà in poi vengono continuamente reclutati in gruppi per avviare la follicologenesi, un processo che richiede negli esseri umani circa 6 mesi (13).

Prima di ogni ciclo mestruale vengono reclutati circa 10-15 follicoli primordiali, questa prima fase avviene indipendentemente dall'azione degli ormoni. I follicoli primordiali cominciano a crescere, in particolare la granulosa proliferata e si trasforma in un epitelio composto multistratificato con cellule cuboidali. Queste cellule secernono particolari proteine chiamate ZP che aggregandosi formeranno la zona pellucida, una particolare struttura che riveste l'ovocita all'esterno della membrana plasmatica (13). Questa prima fase della follicologenesi vede quindi il passaggio dal follicolo primordiale, attraverso stadi intermedi, al follicolo secondario chiamato anche follicolo antrale. Lo sviluppo follicolare durante le primissime fasi di crescita è indipendente dalle gonadotropine ed è guidato soltanto da fattori paracrini. Quando i follicoli raggiungono lo stadio preantrale cominciano ad esprimere sulle loro cellule i recettori per le gonadotropine FSH ed LH. I follicoli preantrali si trasformano in follicoli antrali quando compare all'interno del follicolo una cavità chiamata antro follicolare pieno di liquido secreto dalle cellule stesse della granulosa. La progressione verso questo stadio è dovuta all'azione dell'FSH. Il follicolo secondario o antrale viene circondato da cellule dello stroma connettivale dell'ovaio che formano la teca follicolare divisa in teca interna che è quella che produce estrogeni e teca esterna che è costituita da tessuto connettivale. A questo punto solo uno dei follicoli reclutati inizialmente prende il sopravvento, capta la maggior parte dell'FSH prodotto dall'ipofisi e si accresce progressivamente passando allo stadio di follicolo terziario o follicolo di Graaf. Gli altri follicoli che erano stati reclutati vanno incontro ad atrofia. Le cellule della granulosa del follicolo antrale cominciano a produrre estrogeni, questo aumento di estrogeni determina a livello ipofisario la secrezione dell'ormone LH. Il picco di LH ed FSH che avviene intorno al 14° giorno del ciclo ovarico, favorisce il completamento della meiosi dell'ovocita primario e la rottura del follicolo causando l'ovulazione. Durante l'ovulazione, viene espulso l'ovocita che ha raggiunto la completa maturazione circondato da cellule della granulosa; alcune di esse si dispongono intorno alla zona pellucida formando la corona radiata ed altre si disperdono in un agglomerato detto cumulo ooforo. A questo punto il resto del follicolo che rimane nell'ovaio viene invaso da vasi e formerà il corpo luteo che produrrà ormoni, in particolare il progesterone che serve per mantenere l'endometrio uterino nelle condizioni ottimali per accogliere un eventuale embrione (2) (3) (13). Se non avviene la fecondazione dopo circa 10-15 giorni il corpo luteo degenera, si verifica un calo del progesterone che è responsabile della desquamazione dell'endometrio e quindi avviene la mestruazione. Al contrario se inizia la gravidanza il corpo luteo si mantiene attivo fino a quando non ci sarà la produzione di hCG placentare necessario al mantenimento della gestazione.

Nei follicoli primordiali le cellule follicolari rilasciano fattori inibitori della meiosi, per cui gli ovociti primari presenti rimangono bloccati nella profase I (13). Quando i follicoli primordiali sono reclutati per la maturazione, solo nel follicolo dominante l'ovocita si attiverà e comincerà la seconda divisione meiotica, fino allo stadio di metafase II in cui c'è l'espulsione del primo globulo polare. A questo punto l'ovocita maturo viene ovulato, se avviene la fecondazione l'ovulo completa la meiosi II e genera un secondo globulo polare; a questo punto il nucleo aploide dell'ovocita si potrà fondere con il nucleo aploide proveniente dallo spermatozoo per formare lo zigote.

Attualmente il dogma della biologia riproduttiva, per cui il numero di ovociti presenti nell'ovaio alla nascita è predeterminato, è stato messo in discussione (7). Alcune prove sperimentali suggeriscono l'esistenza di cellule staminali, con caratteristiche di cellule germinali e nell'epitelio superficiale dell'ovaio adulto è stata evidenziata una certa attività mitotica. Queste cellule formano una piccola riserva di cellule indifferenziate capaci di autorinnovarsi e mantenere un numero costante di ovociti (12). Questo meccanismo è stato chiamato neo-oogenesi.

Gametogenesi maschile

La gametogenesi maschile, detta anche spermatogenesi, è il processo che porta alla maturazione delle cellule germinali maschili; questa ha luogo nei tubuli seminiferi dei testicoli.

Durante la vita fetale, dopo l'arrivo delle cellule germinali primordiali, il gene *sry* presente sul cromosoma Y, indirizza la gonade indifferenziata a diventare testicolo. Sotto l'influenza genetica i cordoni sessuali primari si addensano, si estendono e ramificano diventando tubuli seminiferi e *rete testis* (13). Alla nascita l'epitelio spermatogenetico, dei tubuli seminiferi del testicolo, è composto da cellule immature del Sertoli che circondano un limitato numero di spermatogoni indifferenziati; sono presenti anche cellule del Leyding che si sviluppano a partire dall'ottava settimana di gravidanza.

Alla pubertà il progressivo aumento di gonadotropine circolanti attiva le cellule del Leyding e del Sertoli permettendo l'inizio della spermatogenesi. Nel testicolo adulto le cellule del Sertoli hanno soprattutto una funzione trofica per le cellule germinali mentre le cellule di Leyding sono deputate alla sintesi degli androgeni che regolano la spermatogenesi (3) (13).

Gli spermatogoni si dividono in due popolazioni: gli Ap (*pale*) mitoticamente attivi e gli Ad (*dark*) che sono più silenti. Dalle divisioni mitotiche degli Ap si generano gli spermatogoni intermedi A1, A2, A3 e A4 e infine gli spermatogoni B differenziati. Da quest'ultimi, per

divisione mitotica si originano gli spermatociti primari che vanno incontro a duplicazione del materiale genetico diventando cellule diploidi. Queste cellule vanno poi incontro a due divisioni meiotiche, originando gli spermatociti secondari che sono cellule aploidi. Durante queste fasi e sotto la spinta delle cellule del Sertoli, avviene contestualmente la migrazione di queste cellule in differenziazione e maturazione, dal compartimento basale dei tubuli seminiferi verso il lume. Gli spermatociti secondari vanno incontro ad un processo di allungamento, si forma l'acrosoma, si ha la condensazione nucleare, si forma il flagello e il volume citoplasmatico si riduce. Durante questo processo lo spermatocita secondario diviene prima uno spermatide e successivamente, dopo l'eliminazione dell'apparato del Golgi, che viene captato dalle cellule del Sertoli, si trasforma in spermatozoo e liberato nel lume del tubulo. La maturazione dello spermatozoo si conclude poi nel contesto della *rete testis*, dell'epididimo e delle vie eiaculatorie e il liquido seminale si arricchisce anche delle secrezioni delle ghiandole accessorie maschili: vescichette seminali e prostata (2) (3).

Meccanismi fisiologici della fertilizzazione

La fecondazione è il processo in cui il gamete maschile e il gamete femminile si fondono formando lo zigote, il primo stadio dell'embriogenesi.

In condizioni fisiologiche il gamete maschile e quello femminile interagiscono tra di loro a livello della tuba del Falloppio. Questo presuppone un adeguato trasporto degli spermatozoi nel tratto genitale femminile ed una normale funzionalità delle tube stesse.

Gli spermatozoi acquisiscono la capacità di fecondare l'ovocita soltanto dopo un processo di attivazione che si verifica nel tratto genitale femminile, questo evento è definito capacitazione.

Durante la migrazione attraverso la vagina, il muco cervicale, l'utero e le tube, avviene la rimozione, dalla superficie dei nemaspermi, dei fattori "decapacitanti" presenti nel plasma seminale e una serie di modificazioni strutturali della membrana: un incremento della permeabilità agli ioni calcio, un'attivazione calcio mediata dall'AMP ciclico e degli enzimi acrosomiali ed una riduzione della carica elettrica negativa superficiale. Questi eventi determinano una iperattivazione dello spermatozoo che aumenta la sua motilità e lo preparano alla reazione acrosomiale che è considerata l'ultima tappa della capacitazione (2).

L'acrosoma è una struttura presente a livello della testa dello spermatozoo che per le sue particolari caratteristiche può essere equiparato ad un lisosoma. Gli enzimi emessi durante la reazione acrosomiale comprendono l'acrosina, la ialuronidasi, la neuraminidasi, la catepsina D e la fosfolipasi A (2). Quando lo spermatozoo arriva a livello della zona pellucida dell'ovocita,

una glicoproteina qui presente, la ZP3, è capace di stabilire un legame stabile con lo spermatozoo e di indurre la reazione acrosomiale (1) (2). Avviene quindi una digestione enzimatica della zona pellucida e la testa dello spermatozoo riesce a penetrare all'interno dell'ovocita. In questa fase l'ovocita subisce una serie di processi che determinano uno stato di refrattarietà alla penetrazione da parte di altri spermatozoi, questo fenomeno è stato definito reazione zonale. Inoltre la fusione dei due gameti avvia la ripresa della meiosi nell'ovocita per cui viene espulso un secondo globulo polare e il nucleo aploide che rimane costituisce il pronucleo femminile. Anche il nucleo dello spermatozoo che è riuscito a penetrare all'interno dell'ovocita subisce un processo di decondensazione del materiale nucleare e la cromatina viene circondata da un'aggregazione di vescicole che dà origine ad una membrana che racchiude il pronucleo maschile. Si forma dunque, a livello tubarico, lo zigote che andrà incontro successivamente ad una serie di divisioni mitotiche; le cellule che derivano da questi eventi sono via via più piccole e prendono il nome di blastomeri (2).

Il primo clivaggio, che avviene dopo 14-20 ore dalla fecondazione, divide l'embrione in due parti uguali, le successive divisioni cellulari si manifestano ad intervalli regolari dando origine a embrioni con un numero di cellule via via più elevato, fino ad arrivare allo stadio di morula, dopo circa 4 giorni dalla fecondazione. In queste prime fasi di sviluppo, che hanno luogo a livello tubarico, l'embrione mantiene pressappoco lo stesso volume dell'ovocita.

Dopo circa 4-5 giorni dalla fecondazione la morula comincia a cavitare e l'embrione si trasforma in una blastocisti che migra verso la cavità uterina. La blastocisti nelle prime fasi possiede ancora la zona pellucida, il numero di blastomeri è all'incirca 180 ed è caratterizzata da una cavità blastocelica che contiene una raccolta di liquido, uno strato di cellule epiteliali piatte esterne che formano il trofoblasto ed una massa eccentrica di cellule, formato interamente da embrioblasti, definito inner cell o massa centrale.

Al momento dell'impianto, che avviene dopo 7 giorni dalla fecondazione, la blastocisti che cresce di volume rompe la zona pellucida, sguscia fuori e dà inizio all'impianto embrionario, se l'endometrio è recettivo. Sulla membrana plasmatica delle cellule cuboidali del trofoblasto sono presenti delle integrine che si legano ai corrispondenti recettori espressi dall'epitelio cilindrico endometriale. In tal modo si verifica l'adesione della blastocisti che inizia a migrare all'interno dell'endometrio. Nella fase di adesione e migrazione la blastocisti si appiattisce per favorire l'attacco alla parete uterina e alcune cellule del trofoblasto assumono una forma allungata e si insinuano tra le cellule epiteliali uterine. Dal nono giorno la blastocisti è

completamente impiantata ed inizia l'invasione della parete dei capillari endometriali ipertrofici che dà l'avvio alla placentazione (11).

Tecniche di PMA

La procreazione medicalmente assistita (PMA) consiste in una serie di tecniche che prevedono la manipolazione di gameti maschili e femminili al fine di ottenere una gravidanza.

Il primo successo nell'uomo, con le tecniche di PMA, è stato ottenuto in Inghilterra il 25 luglio del 1978. Edward e Steptoe, dopo aver prelevato e fecondato un ovocita da un ciclo ovulatorio spontaneo, hanno trasferito in utero un embrione dando origine ad una gravidanza da cui è nata una bambina.

Da allora le tecniche di PMA hanno conosciuto un notevole sviluppo e diffusione in tutto il mondo, risolvendo le problematiche di infertilità di milioni di coppie.

Le tecniche di PMA possono essere suddivise, in base alla loro complessità in metodiche di I°, II° e III° livello.

Le tecniche di I° livello sono semplici e poco invasive; con queste metodiche si cerca di facilitare l'incontro dello spermatozoo con l'ovocita che avviene all'interno del corpo della donna. Le tecniche di II° e III° livello prevedono invece una fecondazione in vitro con trasferimento all'interno dell'utero dell'embrione ottenuto. Tutte le tecniche di PMA prevedono delle fasi preparatorie sia di tipo medico sia di tipo laboratoristico.

La donna che deve sottoporsi ad un ciclo di fecondazione assistita, dopo un adeguato studio clinico da parte del ginecologo, viene sottoposta, nella maggior parte dei casi, ad un trattamento farmacologico di stimolazione ovarica controllata. Questo trattamento terapeutico prevede la somministrazione di gonadotropine, in particolare FSH per circa 10-14 giorni. L'FSH somministrato determina il reclutamento e la maturazione di più follicoli; la follicologenesi viene monitorata poi per diversi giorni, tramite dosaggi ormonali per quantificare il livello di estrogeni, ed ecografie transvaginali per misurare la crescita dei follicoli.

La quantità di FSH somministrato, nettamente superiore a quella che si può riscontrare in un ciclo ovulatorio fisiologico, permette di superare il limite dell'unico follicolo dominante e dunque di ottenere più ovociti maturi in metafase II.

Quando i follicoli antrali raggiungono la dimensione di circa 16-20 mm, la maturazione ovocitaria, viene indotta mediante la somministrazione di hCG che simula il picco fisiologico dell'LH.

Dopo circa 36 ore dalla somministrazione di hCG si procede con la tecnica di PMA scelta in base alle caratteristiche cliniche della coppia e al tipo di infertilità diagnosticata.

Nel caso in cui non ci sono particolari problematiche maschili e le tube della paziente risultano pervie si procede con tecniche di I° livello; in questo caso solitamente la stimolazione ovarica controllata è fatta in modo da ottenere solo uno o due follicoli per evitare gravidanze multiple indesiderate. Per tecnica di I° livello si intende l'inseminazione intrauterina o IUI.

Il giorno in cui si deve procedere alla IUI il seminale dopo circa 30 minuti dalla raccolta viene processato in laboratorio e capacitato. La capacitazione consiste in una serie di trattamenti che permettono la selezione degli spermatozoi mobili e morfologicamente migliori; inoltre queste manipolazioni simulano quei processi che avvengono fisiologicamente all'interno delle vie genitali femminili e che rendono gli spermatozoi capaci di fecondare l'ovocita. Le tecniche di capacitazione possono essere di vario tipo: la capacitazione per centrifugazione su gradienti di densità, il lavaggio con opportuni terreni e la tecnica di *swim up*. In ogni caso queste tecniche permettono l'eliminazione del plasma seminale e si ottengono piccole quantità di terreno con una sospensione di spermatozoi attivati (di solito circa 500 µl) utilizzabili nelle varie tecniche. Nel caso dell'inseminazione, gli spermatozoi così ottenuti vengono aspirati mediante una siringa in un catetere che viene posizionato dal ginecologo all'interno della cavità uterina. A questo punto gli spermatozoi qui depositati si dirigono verso le tube dove possono fecondare l'ovocita. Questo processo è facilitato dalla temporizzazione dell'ovulazione rispetto all'inseminazione.

Per tecniche di II° livello si intendono le metodiche che prevedono la fecondazione in vitro degli ovociti. In questo caso dopo 36 ore dall'hCG la donna viene sottoposta al prelievo ovocitario (*pick up*) mediante puntura e aspirazione transvaginale ecoguidata dei follicoli maturi. Il liquido follicolare prelevato in provette viene osservato allo stereomicroscopio e i complessi cumuli corona ovocita (figura 3) vengono prelevati e messi in coltura in opportuni terreni. Gli ovociti prelevati, classificati secondo la loro qualità e maturità (Tabella 1) vengono scelti e fecondati con la tecnica ritenuta più opportuna.

Figura 3: Complesso Cumulo-Corona

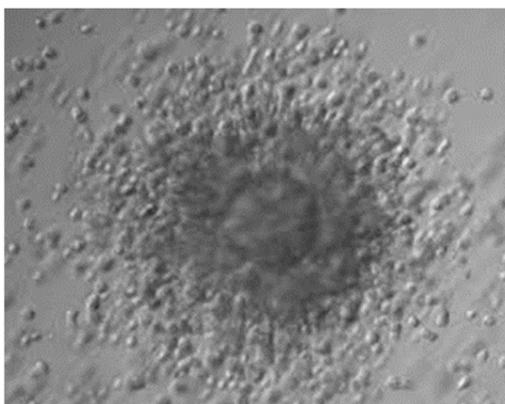
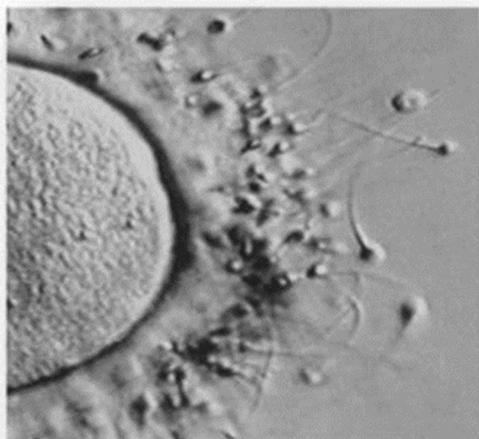


Tabella 1: Classificazione Complessi Cumulo-Corona-Ovocita

MATURITÀ OVOCITARIA	MORFOLOGIA DEL COMPLESSO CUMULO-CORONA-OVOCITA
Ovocita maturo in fase M II	<ul style="list-style-type: none"> • Cumulo espanso • Corona radiata a raggiera • Zona Pellucida distinguibile • Ooplasma chiaro • Presenza di globulo polare (a volte poco visibile) • Cellule della granulosa espanse e ben aggregate
Ovocita immaturo in fase M I	<ul style="list-style-type: none"> • Cumulo espanso • Corona radiata leggermente compatta • Ooplasma chiaro • Globulo polare assente • Cellule della granulosa espanse e ben aggregate
Ovocita immaturo	<ul style="list-style-type: none"> • Se presente, cumulo compatto e denso • Strato compatto e aderente di cellule della corona • Ooplasma scuro con presenza di vescicola germinale • Cellule della granulosa compatte e non aggregate
Ovocita post maturo	<ul style="list-style-type: none"> • Cumulo espanso con ammassi di cellule • Corona radiata a raggiera irregolare e incompleta • Zona pellucida visibile • Ooplasma leggermente granulare e scuro • Globulo polare presente • Cellule della granulosa piccole e relativamente non aggregate
Ovocita atresico	<ul style="list-style-type: none"> • Raramente associati ad un cumulo • Corona radiata aggregata e molto irregolare (se presente) • Zona pellucida visibile • Ooplasma scuro e spesso malformato • Cellule della granulosa con ammassi cellulari molto piccoli

Secondo la metodica classica o FIV gli ovociti prelevati e lasciati con il loro complesso cumulo corona radiata vengono messi in un opportuno terreno e con una quantità determinata di spermatozoi. In genere si prevede un numero di circa 50.000-150.000 spermatozoi capacitati per ogni ovocita da fecondare. I gameti rimangono in co-coltura per circa 16-20 ore (figura 4).

Figura 4: Ovocita in FIV



Passato questo tempo si procede alla decumulazione, cioè all'allontanamento meccanico, mediante l'uso di particolari capillari, delle cellule della corona radiata e del cumulo. In questo modo è possibile visualizzare all'invertoscopio lo zigote se si è verificata la fecondazione. Questa tecnica di fertilizzazione è utilizzata nel caso in cui il liquido seminale non ha particolari anomalie ma la paziente ha delle difficoltà di concepimento dovuto a problemi tubarici o quando si sono avuti insuccessi con le tecniche di I° livello.

Nel caso in cui l'infertilità è di tipo maschile, con oligo-astenozoospermia (pochi spermatozoi all'interno del seminale o spermatozoi poco mobili) la tecnica di scelta è la iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo o ICSI (figura 5). Questa è una tecnica che prevede l'uso di un micromanipolatore corredato da una micropipetta (*holding*) che permette l'immobilizzazione dell'ovocita e da un microago (*injection*), con il quale si preleva un singolo spermatozoo che viene iniettato all'interno dell'ovocita, bucando sia la zona pellucida sia l'oolemma. Gli ovociti da inseminare con tecnica ICSI sono precedentemente decumulati utilizzando l'enzima ialuronidasi, in modo da avere una valutazione più accurata della maturità e qualità ovocitaria e per mettere ben in evidenza il globulo polare. L'iniezione infatti deve essere eseguita nella zona equatoriale dell'ovocita, ponendo dunque il globulo polare alle ore

12 o in alternativa alle ore 6. Questa accortezza viene utilizzata per non danneggiare le strutture dell'ovocita che dovranno costituire il fuso mitotico.

Figura 5: ICSI e Invertoscopia con micromanipolatore Narishige

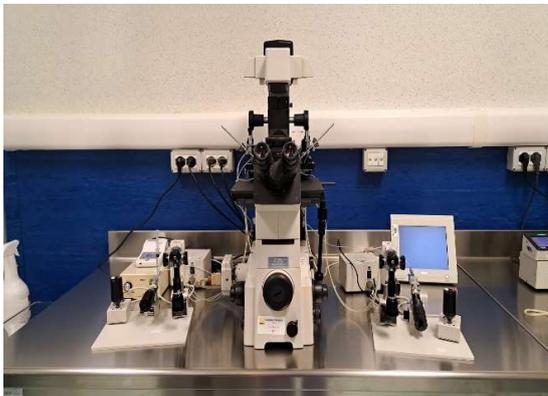
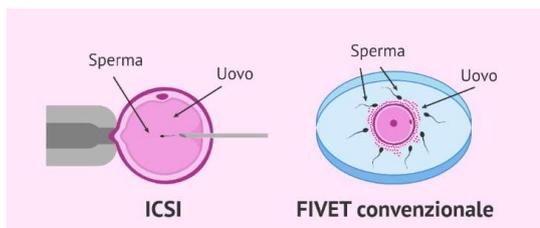


Figura 6: Differenza tra FIV e ICSI



A differenza della FIV, lo zigote dopo 16 - 20 ore è direttamente osservabile all'invertoscopia se è avvenuta la fertilizzazione (figura 7).

Figura 7: Zigote



Tutti gli zigoti ottenuti vengono posti in microgocce di terreno, ricoperte di olio, per mantenere il più possibile stabile la temperatura e l'osmolarità e impedire l'evaporazione (figura 8).

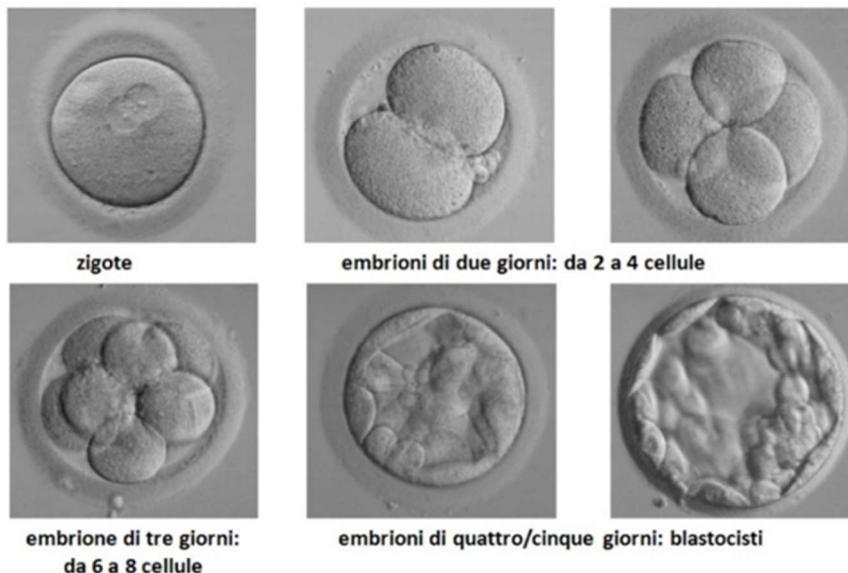
Figura 8: Piastra di coltura



Queste piastre vengono messe in coltura in incubatori a 37°C e con una percentuale del 5% di ossigeno, 6% di CO₂ e in saturazione di vapore acqueo. Gli embrioni in via di sviluppo vengono valutati giornalmente, ad intervalli di circa 24 ore e lasciati in incubatore fino al loro sviluppo a blastocisti che avviene in quinta o sesta giornata (figura 9)

Figura 9: Sviluppo embrionario

Fasi di sviluppo di embrioni umani pre-impianto



Il destino degli embrioni è infine quello di essere trasferiti in utero o in alternativa di essere crioconservati per un futuro *transfer*. È infatti espressamente vietato dalla legge (Legge 40 del 2004) l'eliminazione o l'utilizzo per scopi di ricerca degli embrioni umani vitali.

Gli embrioni ottenuti vengono classificati qualitativamente dagli embriologi in base alla loro morfologia e all'andamento del loro sviluppo (Tabella 2).

Nel centro di Fossano la classificazione degli embrioni di seconda giornata (G2) e terza giornata (G3) si basa su 5 parametri fondamentali:

1. Numero di cellule presenti nell'embrione.
2. Simmetria delle cellule.
3. Presenza di frammentazioni anucleate nello spazio perivitellino dell'embrione.
4. Qualità del citoplasma delle cellule che costituiscono l'embrione
5. Identificazione del nucleo (o di eventuali multinucleazioni) in ogni cellula (solo in G2)

Viene inoltre valutato il tempo di comparsa dei pronuclei ed il tempo di clivaggio.

Condizione indispensabile per effettuare una corretta valutazione degli embrioni è la coltura singola degli embrioni che risultano in questo modo identificabili uno ad uno durante tutta la loro crescita in laboratorio.

Per descrivere la morfologia dell'embrione in G2 e G3 si usa la seguente formula riassuntiva:

$N(X,Y)$

N: numero di blastomeri

X: simmetria dei blastomeri

- 0 se i blastomeri sono di dimensioni uguali
- 1 se i blastomeri sono di dimensioni diverse
- 2 se i blastomeri sono di dimensioni molto diverse

Y: percentuale di frammentazioni anucleate

- 0 (0-10%)
- 1 (>10-30%)
- 2 (>30-50%)
- 3 (>50%)

Tabella 2: Classificazione qualitativa degli embrioni da Rienzi et al., 2005

Caratteristiche	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Punteggio
Stadio pronucleare	Normale			0
	Patologico			2
Clivaggio precoce	Si			0
	No			1
Clivaggio		Da 4 a 5 cell	> 6 cell	0
		Da 2 a 3 and > 5 cell	Da 4 a 6 cell	2
		<2 cell	<4 cell	4
Dimensioni blastomeri		Uguali	Uguali	0
		Diverse		1
			Diverse	2
Frammentazione %		<10	<10	0
		10 – 30	10 – 30	1
		30 – 50	30 – 50	2
		>50	>50	3
Multinucleazione %		Assente	Assente	0
		<50%	<50%	2
		>50%	>50%	4

TIPO DI EMBRIONE	QUALITA'	PUNTEGGIO
EMBRIONE TIPO A	Ottima	0 - 1
EMBRIONE TIPO B	Buona	2 - 3
EMBRIONE TIPO C	Scarsa	4 - 5
EMBRIONE TIPO D	Pessima	>5

Un esempio di embrione di ottima qualità in G2 è 4 (0,0) che significa che è un embrione di 4 cellule tutte della stessa dimensione e senza frammentazione; un analogo embrione in G3 sarà classificato come 8 (0,0).

Nel caso in cui la coltura si prolunga fino allo stadio di blastocisti gli embrioni vengono valutati secondo un altro tipo di classificazione che prende in considerazione lo sviluppo della blastocisti relativamente allo stato di espansione del blastocele, alle caratteristiche morfologiche delle cellule che costituiscono il trofoectoderma e alle caratteristiche morfologiche delle cellule che costituiscono la massa centrale interna o *inner cell*. Si riportano i criteri utilizzati dalla classificazione internazionale più standardizzata a livello mondiale che è quella pubblicata da Gardner e Schoolcraft nel 1999 (tabella 3).

Tabella 3: Classificazione qualitativa delle blastocisti da Gardner e Schoolcraft (1999)

Grandezza	Sviluppo ed espansione della blastocisti
0 oppure M	Morula
1 oppure eB	Early Blastocyst: la cavità blastocelica è inferiore alla metà del volume dell'embrione
2	Il blastocele è poco più grande della metà del volume dell'embrione
3	Il blastocele riempie completamente l'embrione
4	Blastocisti espansa con un volume del blastocele più ampio e una zona pellucida più sottile
5	Il trofoectoderma rompe la zona pellucida e comincia a fuoriuscire
6	Blastocisti completamente fuori dalla zona pellucida
ICM grade	Qualità dell'Inner Cell Mass
A	Numerose cellule che formano un epitelio coesivo
B	Poche cellule che formano un epitelio non coesivo
C	Cellule molto scarse e larghe
TE grade	Qualità del trofoectoderma
A	Numerose cellule, strettamente compatte
B	Poche cellule non strettamente compatte
C	Numero molto scarso di cellule

Le tecniche di III° livello sono tecniche particolarmente invasive. Nel caso dell'uomo consistono nelle tecniche di prelievo chirurgico degli spermatozoi a livello testicolare (TESA e TESE) o epididimario (MESA e PESA). Nel caso della donna sono tecniche attualmente poco utilizzate e comprendono il prelievo degli ovociti della donna per via laparoscopica, la deposizione dei gameti maschili per puntura della tuba (GIFT), la deposizione degli zigoti nella tuba (ZIFT) o degli embrioni (TET) per via laparoscopica.

Terreni di coltura embrionaria

La coltura degli embrioni utilizza terreni specifici che hanno lo scopo di imitare, quanto più fedelmente possibile, *in vitro*, i fluidi presenti nell'apparato riproduttivo femminile dove avviene fisiologicamente la fecondazione e le prime fasi di sviluppo dell'embrione (4).

Dall'esordio delle tecnologie di fecondazione *in vitro* sono stati utilizzati un gran numero di terreni e sistemi di coltura diversi; si è passati da semplici soluzioni saline a terreni molto complessi. Questo sviluppo è legato alle conoscenze sempre più profonde riguardanti la fisiologia, la biochimica, l'epigenetica e la genetica degli embrioni umani (9). L'uso di un terreno appropriato è fondamentale, nei laboratori di PMA, per ottenere buone performance con embrioni di buona qualità e che hanno la più alta probabilità di dare gravidanze evolutive. Le condizioni di coltura devono ridurre al minimo qualsiasi stress sull'embrione e devono evitare le necessità di adattamento dell'embrione stesso perché ciò può influire sul suo potenziale di sviluppo (9). I primi terreni utilizzati erano costituiti sostanzialmente da soluzioni saline bilanciate con aggiunta di carboidrati come glucosio, piruvato e lattato ed erano integrati con il siero della paziente stessa. Questi primi terreni però erano privi di molti componenti che sono risultati successivamente fondamentali per un corretto sviluppo embrionario. Nel tempo sono stati progettati terreni molto più complessi che oltre ad avere sali minerali e carboidrati erano integrati anche con amminoacidi, vitamine, nucleotidi, ioni e molte altre sostanze.

Questi primi terreni integrati erano però non adeguati allo sviluppo delle blastocisti per cui nei primi anni di PMA il trasferimento degli embrioni nell'utero materno avveniva con embrioni di 4-8 cellule e cioè nella fase di sviluppo della seconda-terza giornata. Dalla metà degli anni '90 in poi le case produttrici hanno sviluppato terreni sempre più ricchi ed in grado di supportare la crescita embrionaria fino allo stadio di blastocisti.

Gli ovociti, lo zigote e gli embrioni nei primi stadi di scissione possiedono fisiologicamente meccanismi che regolano l'omeostasi cellulare, hanno poche esigenze nutrizionali e la generazione di ATP necessaria per l'energia metabolica dipende completamente dal metabolismo mitocondriale. L'embrione in queste fasi assorbe bassi livelli di glucosio che viene

metabolizzato attraverso la via del pentoso fosfato per mantenere il potere riducente della cellula. Dopo il terzo giorno di coltura, quando si sviluppa la morula e comincia a formarsi il blastocite, si verifica un cambiamento nelle esigenze nutrizionali, il metabolismo embrionario diventa molto più complesso. Infatti fisiologicamente i nutrienti disponibili all'interno del tratto riproduttivo femminile umano rispecchiano queste esigenze nutrizionali dell'embrione in via di sviluppo. Nelle tube, in cui si trovano gli embrioni nelle prime fasi di sviluppo il fluido presenta bassi livelli di glucosio e alte concentrazioni di piruvato e lattato. Nell'utero che accoglie la blastocisti, il fluido presente possiede bassi livelli di piruvato e lattato ed una concentrazione elevata di glucosio. Inoltre sia il fluido tubarico che il fluido uterino contengono alti livelli di amminoacidi liberi. Sia gli ovociti che gli embrioni possiedono sistemi di trasporto specifici per gli amminoacidi per cui i terreni di coltura sono stati implementati con amminoacidi essenziali e non essenziali perché ciò ha permesso una migliore coltura per uno sviluppo embrionario adeguato. È stato anche dimostrato in alcuni lavori scientifici che gli amminoacidi oltre ad essere dei nutrienti essenziali hanno anche altre funzioni nei terreni: ad esempio hanno anche una funzione di chelanti, osmoliti, tamponi regolatori del pH ed antiossidanti. Nella blastocisti si è visto che gli amminoacidi non essenziali e la glutammina sono indispensabili per la formazione e lo sgusciamento dalla zona pellucida della blastocisti (*hatching*), mentre gli amminoacidi essenziali sono necessari per lo sviluppo e la vitalità delle cellule della massa centrale. Altri componenti fondamentali dei terreni sono le macromolecole e infatti fin dagli esordi i terreni erano supplementati con il siero della paziente, attualmente la supplementazione avviene mediante l'uso di albumina sierica umana ricombinante (9).

Attualmente nei laboratori di PMA sono presenti due diverse scuole di pensiero: per la coltura embrionaria possono essere utilizzati terreni sequenziali o in alternativa si utilizza un unico terreno continuo. L'utilizzo dei terreni sequenziali si ispira al concetto di "*back to nature*"; si utilizzano in questo caso tre tipi di terreni diversi che mimano il più possibile i vari fluidi del tratto genitale femminile. In particolare viene utilizzato un primo terreno particolarmente ricco di glucosio chiamato HTF o *Fertilization* che viene usato per tenere in coltura gli ovociti ancora con il loro complesso corona cumulo e per eseguire l'inseminazione classica FIV. La concentrazione elevata di glucosio è utile in questo caso per il sostentamento metabolico degli spermatozoi. Dallo stadio di zigote fino agli embrioni di 4-8 cellule viene usato un terreno povero di glucosio ma particolarmente ricco di piruvato, lattato e amminoacidi. Questo terreno viene chiamato usualmente *Cleavage*. Raggiunto lo stadio di 8 cellule gli embrioni vengono trasferiti in un terreno molto ricco sia in glucosio sia in amminoacidi essenziali e non essenziali che sostiene la crescita della blastocisti in formazione: questo terreno è il *Blastocyst medium*.

Secondo un'altra scuola di pensiero che è basata sul criterio "*let the embryo choose*", non è necessario fornire terreni diversi per ogni fase dello sviluppo ma basta utilizzare in coltura un terreno particolarmente ricco e l'embrione utilizza man mano i nutrienti presenti di cui ha bisogno. Questi terreni unici rispecchiano nella loro composizione qualitativa quella dei terreni per la coltura delle blastocisti, anche se quantitativamente vi sono alcune differenze (10). Per quanto riguarda i pro della coltura con terreno unico il principale è che non si sottopongono gli embrioni allo stress di modifiche ambientali nel corso della loro crescita. L'inseminazione, se fatta con metodo classico FIV, avviene con le stesse modalità precedentemente descritte per i terreni sequenziali, gli zigoti ottenuti vengono però trasferiti direttamente in terreno continuo e tenuti nella stessa piastra fino allo stadio di blastocisti. A sfavore di questo tipo di coltura alcuni autori pongono l'accento su l'accumulo di sostanze tossiche che provengono dal metabolismo cellulare come ad esempio l'ammonio che deriva dal catabolismo degli amminoacidi. Nelle formulazioni dei terreni continui si è constatato, però, che la sostituzione della glutammina con una sua forma dipeptidica elimina la formazione di livelli tossici di ammonio nella coltura (10).

I dati in letteratura su quale sia il miglior metodo di coltura sono tutt'oggi contrastanti. Alcuni autori come Gardner sono fautori della coltura in terreni sequenziali in quanto secondo i loro studi il tasso di impianto e di gravidanze evolutive risulta più elevato (9). Altri autori invece sostengono che il tasso di sviluppo delle blastocisti è più alto nel sistema di coltura a singolo terreno e non ci sono differenze significative tra il tasso di impianto e di gravidanze evolutive (16).

In una review di Sfontorius et al. del 2016, che ha preso in considerazione 20 studi su 528 analizzati, le conclusioni a cui sono giunti gli autori è che non ci sono ancora prove sufficienti che dimostrino la superiorità di un tipo di coltura rispetto ad un altro. Come da loro sottolineato anche l'analisi dei vari lavori è difficoltosa perché sono molto diversi i protocolli utilizzati nei vari laboratori, i criteri di scelta delle pazienti e sono pochi gli studi randomizzati per cui è difficile tirare delle conclusioni definitive (15).

Scopo del lavoro

Le incertezze che si riscontrano nei lavori scientifici pubblicati su questo argomento rappresenta un incentivo per i laboratori di PMA ad effettuare delle valutazioni interne. È particolarmente importante scegliere il sistema colturale che permette di ottenere le migliori performance possibili tenendo conto dei protocolli e delle strutture organizzative del laboratorio stesso.

Lo scopo di questo studio è verificare se ci sono differenze statisticamente significative in merito alla qualità e al numero delle blastocisti ottenute in un sistema colturale rispetto all'altro. L'obiettivo inoltre era anche valutare l'influenza dei diversi terreni sui tassi di impianto e di gravidanza.

Materiali e Metodi

Da Marzo 2023 a Dicembre 2023 tutte le pazienti, afferenti al centro PMA di Fossano selezionate per un trattamento di PMA di II livello, sono state indirizzate casualmente verso un sistema di coltura con terreni sequenziali o in alternativa verso il sistema di coltura con terreno continuo. Dai dati raccolti sono state eliminate tutte le donne che non hanno avuto una coltura degli embrioni fino allo stadio di blastocisti. Per cui sono state eliminate le donne che hanno fatto il transfer in G2 o G3 e quelle che non hanno avuto embrioni evolutivi. Sono state selezionate solo le donne che hanno eseguito almeno un transfer a fresco o da scongelamento di embrioni. In letteratura è riportato che non c'è differenza statisticamente significativa nel tasso di impianto da embrioni scongelati rispetto ad embrioni trasferiti a fresco (18).

Abbiamo quindi ottenuto due gruppi numericamente confrontabili ed omogenei per età; un gruppo di 39 donne i cui embrioni sono stati tenuti in coltura con il terreno sequenziale ed un gruppo di 38 donne i cui embrioni sono stati tenuti in coltura con il terreno singolo.

Per l'analisi statistica dei dati sono stati usati il test F per effettuare il confronto delle varianze tra due variabili; è un test di ipotesi basato sulla distribuzione F di Fisher-Snedecor ed è volto a verificare l'ipotesi che due popolazioni che seguono entrambe distribuzioni normali abbiano la stessa varianza. Per confrontare le medie delle variabili studiate abbiamo utilizzato il test T Student che ci ha permesso di capire se c'erano differenze significative tra i due gruppi con distribuzione normale. Nel caso invece dei dati non distribuiti normalmente abbiamo utilizzato un test non parametrico, il test Chi Quadro, per misurare la distanza tra i valori osservati nel campione e quelli attesi sotto l'ipotesi di indipendenza.

Al *pick up* gli ovociti prelevati di entrambi i gruppi sono stati messi in coltura in terreno *Fertilization* GEM della Biomedics.

Per le pazienti che hanno effettuato FIV la co-coltura degli ovociti e dei gameti maschili è proseguita nello stesso tipo di terreno per circa 16-20 ore.

Nelle pazienti indirizzate verso la ICSI gli ovociti, dopo circa 2-3 ore dal prelievo, sono stati decumulati enzimaticamente con ialuronidasi e messi in coltura in terreno *Cleavage* GEM della Biomedics fino alla iniezione intracitoplasmatica del gamete maschile; dopo la ICSI gli ovociti iniettati hanno proseguito la coltura in *Cleavage* per circa 16-18 ore.

Dopo la fertilizzazione gli zigoti hanno subito un destino diverso nei due gruppi. Nel caso degli ovociti indirizzati verso la coltura con terreni sequenziali gli zigoti sono rimasti in *Cleavage*

fino allo stadio G3 che prevede embrioni di 8 o più cellule. Questi embrioni sono stati successivamente trasferiti in terreno *Blastocyst Medium* GEM della Biomedics fino al loro sviluppo a blastocisti in quinta/sesta giornata.

Nel caso degli ovociti indirizzati verso la coltura con terreno singolo gli zigoti sono stati posti in terreno *Continuous Single Culture-NX Complete* della FUJIFILM e tenuti nello stesso terreno senza cambi fino a G5; per gli embrioni che non hanno raggiunto lo stadio di blastocisti in G5 e la cui coltura si è protratta fino alla sesta giornata, si è proceduto ad un cambio di terreno (*refresh*) sempre con terreno singolo per allontanare eventuali cataboliti tossici accumulati durante la coltura prolungata; gli embrioni sono stati ricontrollati dopo circa 24 ore in G6 e quelli che risultavano evoluti allo stadio di blastocisti sono stati crioconservati.

La composizione dei terreni utilizzata è riportata nella tabella 4.

Per quanto riguarda i terreni della GEMS Biomedics nelle schede tecniche non è riportato l'elenco di tutti gli amminoacidi presenti, inoltre la composizione dei terreni *Cleavage* e *Blastocyst* è qualitativamente uguale ma quantitativamente diversa.

Tutti i terreni sia della FUJIFILM sia della GEMS Biomedics sono addizionati con EDTA, bicarbonato di sodio usato come sistema tampone, Gentamicina solfato come antibiotico e Albumina sierica umana.

Le piastre utilizzate per le colture sono della NUNC e certificate per PMA.

Gli incubatori utilizzati sono incubatori *Minc Benchtop Incubator* della COOK Medical collegati a bombole di miscela certificate per uso medico, contenenti 6% di CO₂, 5% di O₂, 89% N₂; il gas viene fatto fluire in fiasche di acqua sterile prima di essere immesso nell'incubatore. La temperatura di coltura è mantenuta stabile a 37 °C.

La coltura degli zigoti e degli embrioni è avvenuta in gocce di terreno da 25 µl ricoperte da circa 4 ml di olio per coltura embrionaria. Il sistema di coltura sotto olio e l'aria flussata nell'acqua sono fondamentali per evitare l'evaporazione del terreno e mantenere stabili il pH e l'osmolarità.

La valutazione degli embrioni è stata effettuata all'invertoscopio su piastre riscaldate a 37°C ed eseguita nel minor tempo possibile per evitare alterazioni nel terreno.

Tabella n 4: Composizione terreni di coltura

Componenti dei terreni di coltura				
	Fertilization Medium GEMS	Cleavage Medium GEMS	Blastocyst Medium GEMS	Continuons Single- NX Complete FUJIFILM
Amminoacidi	Alanil glutammina	Alanilglutammina	Alanilgutammina	Alanina
	Taurina	Taurina	Taurina	Arginina
	Glicina	Glicina	Glicina	Asparagina
	Carnitina	Carnitina	Carnitina	Acido aspartico
	Amminoacidi non essenziali	Amminoacidi non essenziali	Amminoacidi non essenziali	Cistina
		Amminoacidi essenziali	Amminoacidi essenziali	Acido glutammico
				Alanilglutammina
				Glicina
				Istidina
				Isoleucina
				Leucina
				Lisina
				Metionina
				Fenilalanina
				Prolina
			Serina	
			Treonina	
			Triptofano	
			Tirosina	
			Valina	
Sali e ioni	Cloruro di sodio	Cloruro di sodio	Cloruro di sodio	Cloruro di sodio
	Cloruro di potassio	Cloruro di potassio	Cloruro di potassio	Cloruro di potassio
	Fosfato di potassio	Fosfato di potassio	Fosfato di potassio	Fosfato di potassio
	Solfato di magnesio	Solfato di magnesio	Solfato di magnesio	Cloruro di calcio
	Cloruro di magnesio	Cloruro di magnesio	Cloruro di magnesio	Solfato di magnesio
				Citrato di sodio
Substrati energetici	Piruvato di sodio	Piruvato di sodio	Piruvato di sodio	glucosio
	Glucosio	glucosio	glucosio	piruvato
	Lattato di calcio	Lattato di calcio	Lattato di calcio	lattato
Altri componenti	Acido D pantotenico	Acido D pantotenico	Acido D pantotenico	
		Acido folico	Acido folico	
		Cobalamina	Cobalamina	
		Ascorbato di Sodio	Ascorbato di sodio	

Risultati ed elaborazione dati

I risultati ottenuti, raccolti in un database, sono riassunti nella tabella sottostante (Tabella 5).

Tabella 5: dati raccolti durante lo studio

Dati	Coltura terreno sequenziale	Coltura terreno singolo
Numero di casi	39	38
Numero di ovociti maturi ottenuti	243	258
Numero di FIV	22 (56,41%)	21 (55,26%)
Numero di ICSI	17 (43,58%)	17 (44,73%)
Numero di zigoti ottenuti	182	208
Numero di blastocisti ottenute	75	89
Numero di blastocisti di buona qualità	38 (50,66%)	29 (32,58%)

L'analisi statistica delle variabili è stata eseguita utilizzando il software Excel ed i principali dati ottenuti sono riportati nella tabella 6.

Tabella 6: variabili analizzate

Variabili analizzate	Terreno Sequenziale (n.39)	Terreno Continuo (n.38)	Test F p value	Test T p value	Test Chi Quadro p value
Età media	34,64 ±8,06 (2 σ) (27≤età ≤43)	34,79±6,94 (2 σ) (28≤età≤ 42)	0,49	0,86	/
Media ovociti MII	6,29 ± 5,86 (2 σ) (2≤MII ≤15)	6,79±6,7 (2σ) (1≤MII≤14)	0,42	0,49	
Media di zigoti	4,39±3,94 (2σ) (2≤zigoti≤15)	5,47 ±5,92 (2σ) (1≤zigoti≤12)	0,42	0,24	/
Media blastocisti	1,92 ±2,3 (2σ) (1≤blastocisti≤6)	2,34 ±2,76 (2σ) (1≤blastocisti≤6)	0,27	0,15	/
Numero di blastocisti di buona qualità (AA/AB/BA)	0≤blasto qualità<3	0≤blasto qualità≤2	/	/	1
Numero di gravidanze ottenute	20 (51,28%)	22 (57,89%)	/	/	0,55

Per quanto riguarda l'età media delle pazienti il p-value del test F dell'età ci dice che le due varianze sono uguali. Il p-value del T test risulta 0,86 dunque nettamente superiore a 0,05 per cui la differenza dell'età nei due gruppi non è significativa.

Per quanto riguarda la media del numero degli zigoti, la media del numero delle blastocisti e la media del numero degli ovociti MII abbiamo sempre ottenuto valori di p-value al T test che ci confermano che non esistono differenze significative tra i due gruppi di coltura. Anche in questo caso il test F attesta che le varianze delle variabili nei due gruppi sono uguali.

L'unica variabile che differenzia i due gruppi è pertanto solo il tipo di terreno utilizzato nella coltura embrionaria.

Per quanto riguarda l'analisi statistica del numero di blastocisti di buona qualità abbiamo utilizzato il test non parametrico Chi Quadro ed abbiamo posto come:

- 0: assenza di blastocisti di buona qualità
- 1: presenza di blastocisti di buona qualità

Analizzando i dati grezzi abbiamo ricavato le frequenze osservate di blastocisti di buona qualità ottenute nei due gruppi (Tabella 7)

Tabella 7: frequenze osservate blastocisti di buona qualità

Blastocisti AA/AB/BA	Terreno sequenziale	Terreno continuo	Totale
0	12	13	25
1	27	25	52
Totale	39	38	77

Successivamente abbiamo calcolato le frequenze relative delle blastocisti di buona qualità nei due gruppi (Tabella 8)

Tabella 8: frequenze relative blastocisti

Blastocisti AA/AB/BA	Terreno sequenziale	Terreno continuo
0	30,77%	34,21%
1	69,23%	65,78%

Osservando le percentuali ottenute si evince che la percentuale di blastocisti di qualità è maggiore nel gruppo del terreno sequenziale rispetto al gruppo del terreno continuo. Per verificare se tale differenza era significativa abbiamo calcolato le frequenze attese delle blastocisti di buona qualità per poter applicare il test Chi Quadro (Tabella 9)

Tabella 9: frequenze attese blastocisti

Blastocisti AA/AB/BA	Terreno sequenziale	Terreno continuo	Totale
0	12,5	12,5	25
1	26	26	52
Totale	38,5	38,5	77

Il p-value ottenuto con il Chi Quadro è risultato uguale ad 1 dunque non permette di rifiutare l'ipotesi nulla di uguale proporzione di soggetti con almeno una blastocisti di qualità nei 2 gruppi.

Anche per l'analisi statistica delle gravidanze abbiamo utilizzato il Test Chi Quadro.

Le frequenze osservate delle gravidanze sono riportate nella tabella 10, nella tabella 11 abbiamo riportato le frequenze relative ed infine nella tabella 12 le frequenze attese.

Tabella 10: Frequenze osservate delle gravidanze

Gravidanza	Terreno sequenziale	Terreno continuo	Totale
No	19	16	35
Si	20	22	42
Totale	39	38	77

Tabella 11: Frequenze relative gravidanze

Gravidanza	Terreno sequenziale	Terreno continuo
No	48,71%	42,19%
Si	51,28%	57,89%

Tabella 12: Frequenze attese gravidanze

Gravidanza	Terreno sequenziale	Terreno continuo	Totale
No	17,5	17,5	45
Si	21	21	32
Totale	38,5	38,5	77

A differenza di quanto abbiamo notato per quanto riguarda la percentuale delle blastocisti di qualità ottenute, la percentuale di gravidanze nel gruppo degli embrioni in coltura con terreno continuo è risultata leggermente superiore rispetto a quella ottenuta nell'altro gruppo.

Il p-value ottenuto al Test Chi Quadro è risultato uguale a 0,55 e anche in questo caso tale valore ci suggerisce che non esiste una differenza statisticamente significativa nei due gruppi analizzati.

Discussione e Conclusioni

Come sottolineato da diversi autori, la coltura embrionaria è uno dei punti critici nel laboratorio di PMA. In un lavoro pubblicato nel 2015, Kleijkers et al. hanno visto che nei 6 giorni di coltura in vitro, gli embrioni umani hanno un'espressione dei geni coinvolti nell'apoptosi, nella degradazione proteica, nel metabolismo e nella regolazione del ciclo cellulare, molto diversa nei vari tipi di terreni di coltura utilizzati (6).

È dunque di fondamentale importanza la qualità dei terreni usati. Condizioni non ottimali, come terreni poveri dei nutrienti essenziali per il corretto sviluppo, incubatori non altamente performanti, sbalzi di temperatura protratti per lungo tempo e cambiamenti di osmolarità e concentrazione dei terreni, possono interferire pesantemente con la crescita degli embrioni stessi e soprattutto con l'attecchimento e l'inizio di una gravidanza clinica.

Un parametro utilizzato per valutare la qualità degli embrioni e di conseguenza la loro possibilità di sviluppo ulteriore è stato, fin dagli esordi della PMA, quello della valutazione da parte degli embriologi dei parametri morfologici. Anche se la maggior parte degli embriologi si attiene a stretti criteri di caratteristiche degli embrioni per la loro valutazione, questo non impedisce che ci sia anche un problema legato alla soggettività del giudizio dell'operatore per cui non ci sono dei criteri realmente oggettivi che permettano un confronto tra operatore-operatore e in maggior misura tra i vari laboratori. Questo problema implica una reale difficoltà nel valutare i diversi lavori presenti in letteratura che prendono in considerazione la qualità embrionaria.

Altro punto critico sono le condizioni operative che possono essere notevolmente diverse nei vari laboratori. Operatori più esperti, ad esempio, possono essere particolarmente rapidi nelle valutazioni degli embrioni riducendone sensibilmente i tempi di esposizione a temperature e a condizioni poco idonee.

Attualmente alcune importanti innovazioni nell'ambito dei laboratori PMA, come ad esempio l'introduzione di incubatori time lapse che permettono la valutazione dello sviluppo embrionario senza togliere dall'incubatore gli embrioni e la visualizzazione in continuo, e non solo ogni 24 ore, della loro crescita, permette agli embriologi di avere un quadro più ampio della qualità e dell'evoluzione degli embrioni stessi.

Altro strumento molto importante è l'analisi genetica preimpianto che permette di riconoscere blastocisti aneuploidi. Da quando è stato inserito questo strumento, si è visto infatti che non

poche blastocisti considerate, da un punto di vista esclusivamente morfologico, di ottima qualità presentano gravi anomalie genetiche che ne impediscono l'attecchimento o gravidanze evolutive.

Recentemente molti autori evidenziano la necessità di biomarcatori molecolari, dosabili direttamente nei terreni delle colture, in grado di dare informazioni sulla reale possibilità di crescita, impianto e gravidanza evolutiva delle blastocisti da trasferire nelle procedure di PMA (11) (17). Questo ulteriore sviluppo permetterebbe di superare la diagnosi pre-impianto, che rappresenta comunque un evento traumatico a carico dell'embrione e, non di rado, fornisce risultati dubbi. L'analisi, infatti è eseguita su cellule del trofoectoderma e dunque non garantisce che il patrimonio genetico sia perfettamente identico anche nelle cellule dell'*inner cell*.

Per i motivi sopra esposti tutti gli studi, che come il nostro, hanno cercato di confrontare terreni o metodiche culturali, hanno incontrato numerose limitazioni metodologiche che non permettono quindi di avere delle risposte definitive in merito.

Nel nostro studio i due gruppi sono risultati omogenei per quanto riguarda l'età, il numero di ovociti maturi, il numero di zigoti ottenuti ed il numero di blastocisti ottenute. Abbiamo osservato un maggior numero di gravidanze nel gruppo delle pazienti con il terreno continuo anche se il numero di blastocisti di buona qualità era leggermente più alta nell'altro gruppo.

Le differenze però osservate non sono risultate statisticamente significative per cui è necessario estendere ulteriormente lo studio per valutare se questa tendenza si mantiene nel tempo.

Sarebbe inoltre auspicabile poter sottoporre tutte le blastocisti ottenute ad indagine genetica pre-impianto e utilizzare per la coltura un incubatore time lapse. Purtroppo i problemi legati al costo beneficio inficiano questa possibilità.

Dai dati estrapolati fino ad ora si potrebbe ipotizzare che è meno traumatico, per gli embrioni, restare in un terreno il cui dato negativo è l'accumulo di cataboliti piuttosto che il riadattamento continuo a nuovi terreni. Tuttavia osservando i dati ottenuti dall'analisi statistica è possibile constatare che, come già affermato in studi precedenti, le due tecniche di coltura usate in PMA siano equipollenti; di conseguenza i laboratori possono scegliere l'una o l'altra tecnica in base ad esigenze di tipo organizzativo.

Bibliografia

1. **Cannarella R., Condorelli R.A., Mongioì L. M., La Vignera S., and Calogero A.E.** 2020 Mar 3; Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility 10.3390/ijms21051728
2. **Cantarelli M., Cefalù E., Cittadini E., La Sala G.B.**, Testo atlante di biologia della riproduzione umana
3. **Gandini L. e Lenzi A.**, Biotecnologie della riproduzione umana
4. **Geber S., Bossi R., Guimarães F., Valle M., Sampaio M.**2012. Effects of transfer of embryos independently cultured in essential and sequential culture media on pregnancy rates in assisted reproduction cycles. J Assist Reprod Genet. 29(10):1097-101.
5. **Inhorn M.C., Patrizio P.** 2015 Mar 22; Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century 21(4):411-26. doi: 10.1093/humupd/dmv016
6. **Kleijkers S.H.M., Eijssen L.M.T., Coonen E., Derhaag J.G., Mantikou E., Jonker M.J., Mastenbroek S., Repping S., Evers J.L.H.,Dumoulin J.C.M., van Montfoort A.P.A.**,2015 Jul 22; Differences in gene expression profiles between human preimplantation embryos cultured in two different IVF culture media 30(10):2303-11.
7. **Krajnik K., Mietkiewska K., Skowronska A., Kordowitzki P. and Skowronski M.T.** 2023 Apr 6; Oogenesis in Women: From Molecular Regulatory Pathways and Maternal Age to Stem Cells 10.3390/ijms24076837
8. **Lamb D. J., Matzuk M.M.** 2008 Nov; The biology of infertility: research advances and clinical challenges 10.1038/nm.f.1895
9. **Lane M., Gardner D.K.** 2007 Feb; Embryo culture medium: which is the best? 21(1):83-100.
10. **Morbeck D.E.,Baumann N.A., Oglesbee D.** 2017 Apr; Composition of single-step media used for human embryo culture 10.1016/j.fertnstert.2017.01.007
11. **Niakan K.K.,Han J., Pedersen R.A.,Simon C. and Reijo Pera R.A.** marzo 2012; Human pre-implantation embryo development 10.1242/dev.060426.
12. **Porrás-Gómez T.J., Mendoza N.M.** 2017 Aug 7; Neo-oogenesis in mammals
 - a. 10.1017/S0967199417000363

13. **Revelli A., Tur-Kaspa I., Holte J.G., Massobrio M.,** Biotechnology of Human Reproduction
14. **Sánchez F., Smitz J.** 2012 Dec; Molecular control of oogenesis 10.1016/j.bbadis.
15. **Sfontouris I.A.,Martins W.P.,Nastri C.O.,Viana I.G.R.,Navarro P.A.,Fenning N.R., van der Poel S., Rienzi L.,Racowsky C.** 8 2016 Oct; Blastocyst culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials 33(10):1261-1272. doi: 10.1007/s10815-016-0774-5.
16. **Tao P., Zhou W., Yan X., Wu R., Cheng L., Ye Y., Wang Z.,Li Y.** 2022; Effect of sequential versus single-step culture medium on IVF treatments, including embryo and clinical outcomes: a prospective randomized study 305:757–765
17. **Vani V., Vasan S.S., Adiga S.K., Roy Varsha S., Seshagiri P.B.** 2022 Oct 27; Molecular regulators of human blastocyst development and hatching: Their significance in implantation and pregnancy outcome 10.1111/aji.13635

Sitografia

18. **Istituto Superiore Sanità** 17° Report attività del registro nazionale italiano della procreazione medicalmente assistita attività 2021
<https://www.iss.it/documents/20126/6898329/17%C2%B0+Report+Attivit%C3%A0+PMA+dati+2021.pdf/2b5fda51-63d7-571a-c4b6-7986fc1e13d8?t=1700751053544>
 Gennaio 2024
19. **World Health Organization** 2023 Infertility Prevalence Estimates, 1990–2021
<https://www.who.int/publications/i/item/978920068315> Gennaio 2024
20. <https://www.epicentro.iss.it/pma/fertilita> Gennaio 2024
21. <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/i/infertilita> Gennaio 2024
22. <https://www.epicentro.iss.it/ben/2023/1/infertilita-maschile-prevenzione> Gennaio 2024