



Università degli studi di Messina

Dipartimento di Patologia umana dell'Adulto e dell'Età evolutiva
"GAETANO BARRESI"

Dottorato di Ricerca XXIX Ciclo

Biotecnologie Mediche e Chirurgiche

Settore scientifico disciplinare: Med 40 (6/H1)

Coordinatore: *Prof. Giovanni Raimondo*

**STUDIO DELLE POSSIBILITA' DI FECONDAZIONE E
SVILUPPO DI OVOCITI UMANI CRIOCONSERVATI
MEDIANTE TECNICA DI VITRIFICAZIONE
(APERTA O CHIUSA) IN PAZIENTI SOTTOPOSTE A P.M.A.**

Tesi di Dottorato di:
Dott. Giuseppe Gullo

Tutor:
Chiar.mo Prof. Rosario D'Anna

Triennio 2014/2016

INDICE

PARTE PRIMA

1.1 Criobiologia	p.1
1.2 Storia della crioconservazione ovocitaria	p.4
<i>Teoria della crioconservazione</i>	p.7
<i>Metodo di raffreddamento lento</i>	p.9
1.3 Tecnica di Vitrificazione	p.10
<i>Vitrificazione meglio del raffreddamento lento?</i>	p.11
1.4 Tossicità dei crioprotettori e relativi danni	p.13
<i>Evitare tossicità da CP</i>	p.14
1.5 Crioconservazione e tecnologie di riproduzione assistita	p.15
1.6 Vitrificazione in P.M.A.(Procreazione Medicalmente Assistita)	p.16
<i>Conservazione delle fertilità</i>	p.17
<i>La vitrificazione degli ovociti per ragioni etiche e sociali</i>	p.18
1.7 Vitrificazione ovocitaria in programmi di ovodonazione	p.19
<i>La Tecnica</i>	p.20
1.8 Dispositivi Aperti e Chiusi	p.24
<i>Outcome perinatali, neonatali ed epigenetici</i>	p.28

PARTE SECONDA

2.0 NOSTRA ESPERIENZA	p.30
<i>Materiali e metodi</i>	p.33
<i>Caratteristiche donatrici e riceventi</i>	p.34
2.1 Protocolli di stimolazione ovarica donatrici	p.35
2.2 Preparazione endometriale riceventi	p.36
<i>Pick up ovocitario, fecondazione e valutazione embrioni</i>	p.37
2.3 OUTCOMES	p.38
2.4 PROTOCOLLI DI VITRIFICAZIONE	
<i>Open / Closed</i>	p.39-41

2.5 RISULTATI CLINICAL TRIAL 1	p.44
<i>Analisi e dimensione del campione</i>	p.44
2.6 Procedure di vitrificazione e riscaldamento	p.47
2.7 Esposizione a soluzioni di CP con utilizzo di sistema chiuso	p.48
<i>Analisi statistica</i>	p.49
2. CLINICAL TRIAL 2	p.52
<i>Procedure di laboratorio</i>	p.54
<i>Vitrificazione ovocitaria con sistema chiuso</i>	p.55
<i>Outcomes: primari e secondari</i>	p.56
RISULTATI	p.57
DISCUSSIONE	p.61
BIBLIOGRAFIA	p.67

PARTE PRIMA

Criobiologia

La scienza della criobiologia studia tutte le manifestazioni connesse con lo sviluppo della vita e la sua preservazione alle basse temperature. Le prime nozioni di criobiologia risalgono ai primi anni del 1950, quando furono avviati i primi studi finalizzati allo sviluppo delle conoscenze della biologia (3-6). Da allora si sono avuti molti progressi con lo sviluppo di nuove tecniche finalizzate all'apprendimento dell'adattamento a temperature considerate estreme.

L'azione negativa del freddo si verifica principalmente in due modi. La prima è in relazione con la distruzione della vita e la seconda con la conservazione della stessa ad un livello con capacità funzionali ridotte. Questi effetti sono comunemente visibili in natura in particolare negli animali a sangue freddo dove questo arco temporale può perdurare più a lungo e definito letargo. Pertanto, la definizione di criobiologia è lo studio degli organismi viventi alle basse temperature.

I medium utilizzati in criobiologia trovano applicazione a temperature molto più basse di quelle osservate in ambienti naturali. Il più comunemente utilizzato è l'azoto liquido (-196°C), che può agire determinando il danneggiamento o la conservazione dei tessuti per anni.

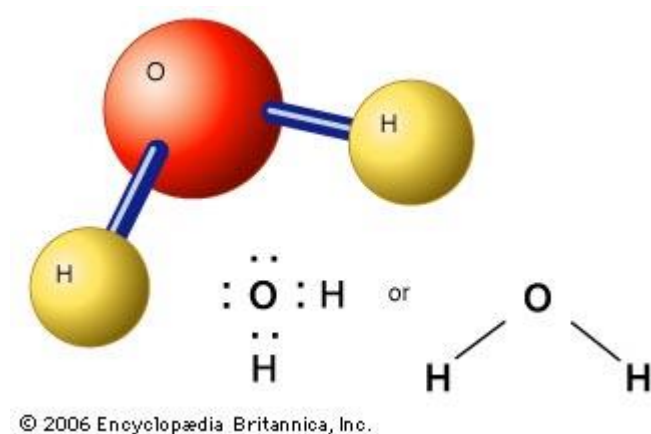
Lo sviluppo di metodiche di prevenzione di tutti i fattori che portano alla morte cellulare ha finalmente portato a risultati significativi per quanto concerne le applicazioni pratiche per la conservazione a lungo termine sia di cellule che di tessuti viventi. Nel settore dell'industria alimentare, i microrganismi utilizzati nella produzione di formaggio possono essere congelati, conservati e trasportati senza perdita di produzione di acido lattico.

In campo medico, è comunemente noto che il sangue o suoi componenti possono essere criopreservati e conservati per usi futuri.

L'acqua rappresenta un importante componente nel processo di crioconservazione. È conoscenza comune che essa costituisca la molecola (figura 1) fondamentale della vita ed essenziale per la sopravvivenza di tutte le forme di vita ad oggi conosciute grazie anche

alle molteplici e distinte proprietà che risultano essere indispensabili per lo sviluppo e la proliferazione. Prima di tutto, permette la reazione di composti organici. In secondo luogo, è il solvente di molti soluti del corpo e riveste un ruolo principale in molti processi metabolici del corpo. Pertanto da considerarsi come il coordinatore principale dei processi metabolici e cellulari con fine ultimo quello di determinare la preservazione della vita.

Figura 1. La molecola dell'acqua (H₂O)



Le basse temperature possono avere un effetto negativo sui processi metabolici. In effetti, la caduta della temperatura può causare un rallentamento dei processi metabolici cellulari, mentre condizioni di temperature estremamente basse potrebbero tradursi in morte cellulare.

Il processo di congelamento determina la cristallizzazione dell'acqua, mentre i materiali disciolti o sospesi si concentrano nel liquido rimanente. Nella cellula vivente, questo processo è piuttosto distruttivo. Durante un processo a lento congelamento, il ghiaccio si comincia a formare prima nel fluido che circonda le cellule, e la concentrazione dei materiali disciolti nel restante liquido aumenta. La disidratazione è il passaggio successivo ed i sali possono concentrarsi a livelli estremamente elevati. Nel frattempo, la disidratazione causata dal congelamento può infine causare una distorsione significativa del rapporto acido-base della soluzione.

La potenziale disidratazione della cellula può incidere in maniera significativa sull'organizzazione cellulare. Essa può determinare il collasso della cellula risultante dalla perdita di acqua e dei suoi componenti intracellulari che normalmente separati per evitare

eventuali interazioni distruttive, possono entrare in contatto. Inoltre, poiché i cristalli di ghiaccio crescono in dimensione, la distruzione delle cellule può avvenire sia da cristalli sia dalla concentrazione dei gradienti delle pareti cellulari. Per evitare la disidratazione, devono essere prese misure preventive per evitare la separazione di acqua sotto forma di ghiaccio puro in modo che tutti i liquidi cellulari possano solidificare insieme.

Vedremo come la criobiologia risulti essere il centro della preservazione della fertilità. Congelamento di liquido seminale per procedure di fecondazione artificiale, di embrioni, ovociti e la crioconservazione delle gonadi sono stati importanti steps scientifici raggiunti gradualmente negli anni di sviluppo di questa scienza. Le conoscenze nell'ambito delle biotecnologie sono in costante evoluzione ed in particolare nel campo della crioconservazione della fertilità, soprattutto con la più recente e dibattuta crioconservazione di tessuto ovarico. Questo capitolo cercherà di esporre brevemente il background scientifico e le nostre conoscenze nell'ambito della criobiologia.

STORIA DELLA CRIOPRESERVAZIONE OVOCITARIA

I mammiferi sono stati la prima specie in cui è stato esaminato l'effetto delle basse temperature. Un primo studio realizzato da Chang et al nel 1950 (7) ha riferito che lo sviluppo degli ovociti di coniglio maturi era significativamente danneggiato in seguito all'esposizione ad una temperatura di 0 °C per 24h. Sherman e Lin svilupparono pochi anni dopo uno studio (8,9), in cui ipotizzarono come ovociti di topo sospesi in un medium contenente glicerolo, raffreddato a -10 °C e tenuti per una o due ore potevano considerarsi utilizzabili per ottenere gravidanze in altrettante riceventi selezionate. Dopo questi primi studi milari ben poco fu approfondito fino alla fine del 1970, epoca in cui furono ottenuti i primi topi nati vivi da ovociti congelati e successivamente scongelati (10). Questi ricercatori utilizzarono lo stesso approccio per la crioconservazione degli embrioni (11,12). In particolare gli ovociti furono esposti a 1,5 M DMSO (dimetilsolfossidio), sottoposti ad un raffreddamento lento a -80 °C prima del congelamento in azoto liquido. La maggior parte dei successivi studi pubblicati ha evidenziato come la metodica di raffreddamento lento fornisca risultati migliori rispetto al raffreddamento veloce. Pertanto, il raffreddamento lento fu comunemente accettato come il metodo migliore per la cripreservazione di ovociti umani (13-15).

L'avanzamento della criobiologia ha anche consentito la realizzazione della prima prole ottenuta da vescicola germinale (GV) di ovociti cripreservati (successivamente maturati e fecondati in vitro) nel 1992 (16). Il primo umano nato dopo corretta attuazione della tecnica su ovociti immaturi è stato nel 1998 (17).

Mentre la tecnica di raffreddamento lento cominciava ad essere utilizzata (30-70%) con discreto successo nella specie umana (18,19), scarsi risultati venivano riportati per altre specie, tra cui suini, bovini, ovini e cavalli (20). Di conseguenza, le cause di eventuali danni e scarso sviluppo di ovociti crioconservati era diventato il centro di numerosi studi condotti nel decennio successivo (21).

Questi studi hanno evidenziato come gli ovociti di mammiferi hanno diverse caratteristiche che contribuiscono alla estrema suscettibilità al danno durante procedura di crioconservazione. Come risultato di questi studi, si è andato sviluppando una metodica di

vitrificazione, applicato nel 1985 in embrioni di topo (22) ed adottata alla fine del 1980 per la crioconservazione di ovociti di topo, ratto, criceto, coniglio, umani, mucca e maiale (21). Il risultato è stato qualche progresso nella crioconservazione ovocitaria di topo (23), molto pochi negli esseri umani (24). Fino a questo momento, ampiamente riconosciuto come gli ovociti di mammiferi risultassero sensibili al raffreddamento ed il grado di sensibilità di refrigerazione direttamente correlato con la sopravvivenza dopo congelamento e scongelamento. Nei primi anni 1990, Steponkus (25) e Mazur (26) hanno riportato come embrioni di *Drosophila*, un tipo di cellula conosciuta per essere altamente suscettibili ai danni da freddo, potessero essere crioconservati con successo attraverso l'utilizzo di un tasso di raffreddamento estremamente rapido. I risultati di queste ricerche hanno portato successivamente Martino et al. (27), ad essere considerato un pioniere della metodica di raffreddamento ultra-rapido per ovociti bovini. In questo studio, gli ovociti contenuti in una soluzione con crioprotettori vennero posizionati su apposite griglie di un microscopio elettronico e immersi direttamente in azoto liquido. Usando questo approccio, la velocità di raffreddamento è stata stimata essere più di $-100.000\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$, ovvero 40 volte più veloce della vitrificazione convenzionale (raffreddamento in cannuccie di plastica). Questa estrema velocità di raffreddamento sembrava tuttavia critica per il successo di ovociti di bovini crioconservati, poiché l'esposizione di ovociti bovini a 0°C per soli cinque secondi determinava una significativa riduzione delle capacità di sviluppo (42% contro il 20% dello sviluppo blastocisti).

Il raffreddamento rapido permette invece agli ovociti di bypassare la zona di temperatura critica (tra 0°C e 15°C) così rapidamente da non dare il tempo necessario a determinare lesioni da raffreddamento. Questo miglioramento delle funzioni e sopravvivenza di ovociti criopreservati ha portato altri ricercatori a creare dispositivi di raffreddamento alternativi, tra cui cannuccie aperte (28), vitrificazione su superficie solida (29), micro gocce (30), cannuccie chiuse (closed pulled straws) (31), cryoloop (32), maglie di nylon (33), gradiente multi-termico (34), e Cryotop (35), i quali consentono velocità di raffreddamento superiori $-100.000\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$. Da allora, questa tecnica che viene generalmente indicata come "vitrificazione volume minimo" (MVV) è stata ampiamente adottata per preservare ovociti in diverse specie, tra cui l'umano (36,37), ed è stato recentemente suggerito MVV come metodo di scelta per la crioconservazione di ovociti ed embrioni (38,39). Per di più la quantificazione del metaboloma e proteoma ovocitario ha rivelato che il congelamento lento ha un effetto drammatico sulla fisiologia cellulare, mentre la vitrificazione sembra aver un effetto negativo ridotto (38). Questi risultati probabilmente conseguiti dalla

limitata esposizione ai crioprotettori. L'analisi della dinamica del fuso meiotico e dello sviluppo embrionale conseguenti a fecondazione in vitro indicano come la vitrificazione sia meno traumatica del congelamento lento, con maggiori possibilità di successo per la crioconservazione degli ovociti (38). Nonostante queste differenze quantitative in vitro, non vi sono differenze in termini di percentuali di impianto o di nati vivi negli esseri umani dopo trasferimento di embrioni prodotti da raffreddamento lento rispetto ad embrioni vitrificati. Nuovi approcci valutati per migliorare il successo di ovociti criopreservati includono l'iniezione intracellulare di trealosio (40), utilizzando medium di colina per ridurre l'accumulo potenzialmente dannoso di sodio (41), e il trattamento con colesterolo caricato con metil-beta ciclodestrina per stabilizzare la membrana plasmatica (42). Studi sulla criosensibilità di ovociti umani maturi (43) condotti nel 1990 hanno portato alla nascita di diversi bambini sani (36,37). L'avvento dell'ICSI (iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi) per fecondare ovociti sia scongelati che freschi permette l'utilizzo di una tecnica che, aggirando la zona di indurimento (impedendo la penetrazione degli spermatozoi) causata dal rilascio prematuro di granuli della corticale ovarica, ha fornito in modo significativo i migliori risultati da fecondazione di ovociti umani crioconservati (44). A metà degli anni 2000 sono stati 200 i bambini sani nati in tutto il mondo con l'uso di ovociti immaturi o maturi criopreservati (45-47). Come conseguenza di questi studi, la crioconservazione è sempre più stata considerata come una delle maggiori opzioni per la conservazione della fertilità delle donne nel 21° secolo.

La ricerca ha inoltre concluso che la crioconservazione di ovociti è molto più difficile che la crioconservazione allo stadio di sviluppo di metafase II (MII). Le ragioni principali sono state identificate e descritte alla fine del 1990. Innanzitutto, l'ovocita è in realtà il più grande tipo di cellula di mammifero ed ha un rapporto superficie / volume relativamente basso rispetto all'embrione (21,48,49). Di conseguenza, gli ovociti hanno una bassa permeabilità all'acqua ed ai crioprotettori e sono altamente suscettibili al danno osmotico (21,49,50). In secondo luogo, gli ovociti sono estremamente sensibili ai danni da freddo (51). L'esposizione di ovociti a bassa temperatura altera la struttura della membrana e la sua funzione, causata da una fase di transizione termotropica e da una separazione di fase dei lipidi di membrana (21). Inoltre, il raffreddamento induce anche esocitosi prematura del granulo corticale, che a sua volta provoca una zona di indurimento (21). In terzo luogo, l'esposizione di ovociti a crioprotettori convenzionali, come propandiolo, glicole etilenico, e DMSO, interrompe le strutture citoscheletriche e aumenta il calcio intracellulare, che a sua volta avvia l'attivazione dell'ovocita e della zona indurimento (21,52). Pertanto, si

percepisce come la crioconservazione ovocitaria debba affrontare diverse sfide e vari steps di sviluppo al fine di migliorarne la tecnica.

TEORIA DELLA CRIOCONSERVAZIONE

Lo scopo della criobiologia è quello di evitare la morte cellulare e mantenere l'immortalità della cellula alle basse temperature. La prima base teorica per la crioconservazione cellulare è stata proposta da Mazur (53,54). La scoperta dei crioprotettori ha reso possibili queste teorie. Il principio generale della crioconservazione è di eliminare le cause principali che sono associate con la morte cellulare ossia i cristalli di ghiaccio intracellulari (53) e le concentrazioni letali di soluti (55), pur mantenendo la capacità funzionale delle particelle intracellulari.

La rimozione di acqua intracellulare e, di conseguenza, la ridotta formazione di ghiaccio intracellulare è ottenuta mediante esposizione a crioprotettori, sostanze che possono ridurre il danno delle cellule durante il congelamento e lo scongelamento. Essi sono suddivisi in due classi fondamentali in base alla loro capacità di diffondere attraverso le membrane cellulari. I crioprotettori penetranti, in grado di muoversi attraverso le membrane cellulari, ed i non penetranti che non vi riescono.

Anche se un buon tasso di sopravvivenza delle cellule congelate è stato osservato occasionalmente anche senza un agente protettivo, solitamente si è visto come i crioprotettori aumentino il tasso di sopravvivenza. La scoperta del glicerolo, prima, e del dimetilsolfossido dopo, per proteggere le cellule eucariotiche contro il danno da gelo ha segnato l'inizio della criobiologia moderna (5). Oggi, i crioprotettori più comunemente utilizzati nel settore sono il glicerolo, il dimetilsolfossido, il glicole etilenico e glicole propilenico. L'azione crioprotettiva di ogni agente crioprotettivo sembra essere simili, ma anche se molte ipotesi sono state avanzate al fine di spiegare il loro meccanismo d'azione, non è ancora chiaro quale ruolo in realtà svolgano all'interno delle soluzioni di congelamento e di vitrificazione.

La tossicità dei crioprotettori si riferisce ad almeno due effetti. La prima è la sostanza chimica che reagisce con le cellule prima della crioconservazione, e il secondo è la sostanza chimica che causa il cambiamento dell'osmosi delle soluzioni di congelamento.

Relativamente basse concentrazioni di crioprotettori sono solitamente utilizzate in criobiologia e, di conseguenza, le sostanze chimiche stesse non costituiscono una grande preoccupazione per la tossicità, anche se le concentrazioni di crioprotettori utilizzate nel rapido raffreddamento sono relativamente alte. I crioprotettori permeano la membrana cellulare spostando acqua attraverso un gradiente osmotico (es. propandiolo-PROH, dimetilsolfossido-DMSO o etilene glicole-EG) o forniscono una pendenza continua ma non permeando la membrana cellulare, (ad esempio saccarosio). I crioprotettori permeanti forniscono anche un aiuto nel bilanciare altri soluti intracellulari che sono letali ad alte concentrazioni. Queste condizioni iperosmotiche letali agiscono anche nei domini tra i cristalli di ghiaccio nell'ambiente extracellulare nel contempo che la temperatura si riduce e, di conseguenza, avviene un'ulteriore disidratazione della cellula. Il grado di disidratazione dipende dalla velocità con cui diminuisce la temperatura (13) e dalla permeabilità delle cellule all'acqua (49). I suddetti principi sono fondamentali per la criobiologia ma sono diversamente applicati nel congelamento lento e nella vitrificazione, i due metodi di crioconservazione nelle tecnologie di riproduzione assistita.

METODO DI RAFFREDDAMENTO LENTO

Nel procedimento a lento raffreddamento, inizialmente le cellule sono esposte a una soluzione semplice con un crioprotettore permeabile (<1.5M PrOH) e di solito, una bassa concentrazione di crioprotettore non permeabile (<0,3M sucrose). Dopo un breve periodo di tempo di esposizione (fino a 10 minuti) per consentire l'assorbimento del crioprotettore, le cellule vengono caricate in cannuce di plastica (in un volume di ~ 200 µl) che sono sigillate su entrambe i lati. Le cannuce vengono poi poste in una macchina di congelamento programmabile che riduce lentamente la temperatura (~ 0,3 °C / min). Quando la temperatura è leggermente inferiore al punto di fusione della soluzione (solitamente circa -7 °C), la cannucina viene distesa in modo da indurre la nucleazione del ghiaccio. Il raffreddamento lento continua, l'osmolarità extracellulare aumenta e l'acqua congela in ghiaccio. Con l'aumento della tonicità, le cellule disidratano. La disidratazione continua durante il raffreddamento lento finché le cellule non sono immerse in azoto liquido, di solito ad una temperatura inferiore a -30 °C. A questo punto, la concentrazione di crioprotettore intracellulare è tale che l'acqua intracellulare rimanente vitrificata, impedendo la formazione di ghiaccio intracellulare (IIF). Durante lo scongelamento, il ghiaccio può riformarsi nuovamente se la soluzione vitrificata riscalda ad una velocità tale da consentire il processo di devitrificazione. Questo avviene quando la temperatura è sufficientemente elevata tale che la mobilità molecolare dell'acqua è aumentata ad un punto in cui le molecole d'acqua possono muoversi e ridisporsi da una posizione vitrificata amorfa disordinata ad una posizione cristallina ordinata. Questo si verifica ben al di sotto del punto di fusione, ed è quindi un problema potenzialmente letale (56,57). Durante lo scongelamento, le cellule disidratate sono esposte a condizioni ipotoniche e reidratate mediante rimozione di crioprotettori e solitamente con un'iniziale aumento delle concentrazioni di crioprotettori non permeanti (58).

TECNICA DI VITRIFICAZIONE

Per raggiungere la *vitrificazione* (cioè uno stato simile al vetro) all'interno di una cellula, sono necessari sia una riduzione del contenuto di acqua sia un citoplasma altamente viscoso (22). Questo è generato da esposizione ad alte concentrazioni di CP permeanti (> 4 M, DMSO, EG, glicerolo) e non permeanti (> 0.5 M, saccarosio) che provocano un notevole restringimento. Tuttavia, al fine di minimizzare l'impatto delle condizioni iperosmotiche, il tempo di esposizione è ridotto a <1 minuto (59). Poiché un'alta concentrazione di un singolo crioprotettore permeante, tuttavia, può di per sé essere letale (60) o può compromettere lo sviluppo (23), crioprotettori multipli (61) sono stati utilizzati in combinazione per ridurre la tossicità del singolo CP, ottenendo una soluzione altamente viscosa (60). L'elevata osmolarità della soluzione di vitrificazione disidrata rapidamente la cellula e l'immersione in azoto liquido la solidifica rapidamente, in modo che l'acqua intracellulare restante non abbia tempo per formare i cristalli di ghiaccio dannosi.

VITRIFICAZIONE MEGLIO DEL RAFFREDDAMENTO LENTO?

La vitrificazione ha dimostrato essere più efficace del raffreddamento lento, poiché è una procedura che elimina la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno delle cellule, lasciando intatti i domini delle stesse. Per spiegare perché risulta essere la migliore tecnica per la crioconservazione occorre comprendere lo schema di figura 1, che si basa sul lavoro di Fahy e colleghi (67) e che l'hanno introdotta nel 1984 come metodo di crioconservazione potenzialmente efficace in embriologia.

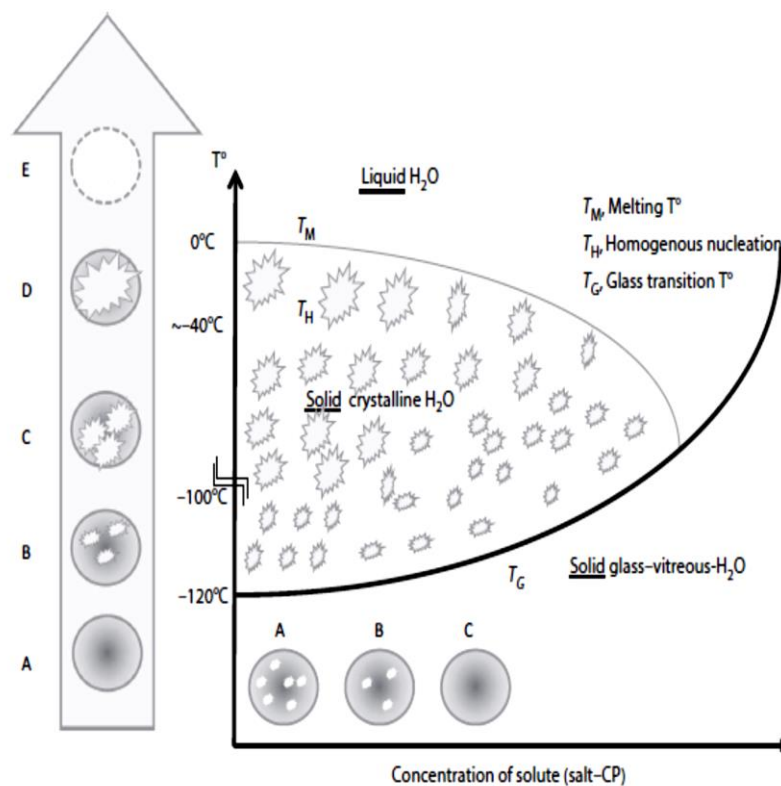


Figura 2

Asse Y (figura 2) rappresenta la temperatura di un liquido (ad esempio acqua o soluzioni isotoniche che usiamo per diluire crioprotettori). Asse X rappresenta la concentrazione dei soluti (ad esempio crioprotettori) che una soluzione contiene. T_M è la temperatura di fusione di una soluzione. Sopra la curva di T_M , la soluzione è in uno stato liquido. T_G è la temperatura di transizione vetrosa. Sotto il T_G il liquido si trasforma in un stato vetroso.

solido. Una delle proprietà fisiche di un liquido è che può essere trasformato in stato vitreo se la temperatura scende rapidamente. Per esempio, quando una quantità di acqua, che si trova a 25°C (temperatura ambiente), immediatamente scende ad una temperatura di -120°C, diventerà vetro solido. Questo sta accadendo perché il tasso di raffreddamento è molto alto e le molecole d'acqua non hanno il tempo di ridistribuirsi nello spazio che vanno occupando. Se la temperatura del liquido cade lentamente, allora le molecole d'acqua hanno il tempo di essere riorganizzate e prendono più spazio e quindi producono nuclei di cristalli di ghiaccio. Quindi, se l'acqua si trova a temperature inferiori a T_M e sopra T_G sarà resa cristalli di ghiaccio. Curve T_M e T_G creano una zona, la zona cristallina. Più veloce è la transizione da T_M a T_g attraverso la zona cristallina, minori saranno le modifiche a cristalli di ghiaccio. La vitrificazione è risultato essere la tecnica di maggior successo al fine di evitare la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno delle cellule: velocità di raffreddamento estremamente elevate. Mentre la procedura a raffreddamento lento ha una velocità di raffreddamento di $\sim 0,3 \text{ } ^\circ\text{C} / \text{min}$, la vitrificazione di circa $20.000 \text{ } ^\circ\text{C} / \text{min}$.

Secondo la figura 2, l'uso di crioprotettori potrebbe minimizzare l'intervallo delle zone cristallina e potrebbe aiutare la generazione dello stato vitreo con velocità di raffreddamento più brevi. Quando la concentrazione dei crioprotettori è maggiore, la generazione dello stato vitreo è più facile. Ma, crioprotettori ad alte concentrazioni sono tossici per le cellule; pertanto vi è un limite nel loro uso.

Infine, il volume della soluzione che viene raffreddata gioca un ruolo significativo nella formazione dello stato vitreo dall'acqua. Più piccola è la soluzione più facilmente è possibile vitrificarla.

Arav ha proposto la seguente equazione (34) che descrive come la probabilità di vitrificazione è influenzato dai parametri di cui sopra:

$$P = \frac{(\text{Cooling rates}) \times (\text{Concentration of cryoprotectants})}{\text{Volume of solution}}$$

Secondo questa equazione, la vitrificazione si ottiene più facilmente quando un piccolo volume di una soluzione con concentrazione appropriata di crioprotettori viene raffreddata rapidamente. Il principio della vitrificazione è garantire tutti questi parametri e questo è il motivo per cui alla fine ha dimostrato di essere più efficace rispetto alla tecnica di raffreddamento lento.

TOSSICITÀ DEI CRIOPROTETTORI E RELATIVI DANNI

Lo scopo dei crioprotettori è quello di evitare danni durante il raffreddamento/congelamento. Tuttavia, questi composti possono essi stessi indurre danni alle cellule. Le condizioni in cui i crioprotettori possono causare danni alle cellule, sono riconducibili a tre fattori: la concentrazione del crioprotettore, il tempo, e la temperatura di esposizione. Crioprotettori sono generalmente non tossici quando utilizzati per brevi periodi di tempo. Al contrario, l'esposizione prolungata o l'esposizione a concentrazioni elevate possono provocare danni nel metabolismo degli agenti crioprotetti, che può successivamente interrompere la funzionalità cellulare e la loro vitalità (64). Per quanto riguarda gli ovociti, composti come DMSO e PROH possono causare depolimerizzazione della tubulina e malformazioni meiotiche (65-67). Oltre che dalla concentrazione e dal tempo di esposizione, la temperatura alla quale vengono utilizzati gli stessi crioprotettori può avere un impatto dannoso sulle cellule. Per esempio a 37 °C i crioprotettori potrebbero causare un'alterata disposizione dei microfilamenti e microtubuli di actina negli ovociti di topo, condizione meno evidente quando in corso di raffreddamento (65). Generalmente, abbassando la temperatura di esposizione al crioprotettore (CP) si ha come conseguenza una diminuzione di assorbimento di agenti tossici dalla cellula.

EVITARE TOSSICITÀ DA CP

La selezione di un crioprotettore adatto, ottimizzarne la sua concentrazione, nonché controllare il tempo e la temperatura di esposizione, è un principio fondamentale che determina la possibilità di danno cellulare da CP. Pertanto, un approccio comune per ridurre la tossicità è quella di combinare diversi crioprotettori, sia permeanti che non permeanti, riducendo in tal modo le singole concentrazioni e riducendo al minimo i danni, pur mantenendo gli effetti protettivi complessivi (12). Combinazioni di più crioprotettori potrebbero indurre un contrastante impatto negativo di un agente a causa dell'impatto negativo di un altro agente (68). Metodologie di introduzione e rimozione dei crioprotettori offrono un'alternativa in termini di riduzione di un potenziale danno. La graduale aggiunta di agenti crioprotettivi, o concentrazioni progressivamente crescenti sono risultati parametri importanti. Inoltre, la rimozione graduale di questi composti in fasi di riscaldamento / scongelamento aiuta a ridurre al minimo lo stress osmotico.

Crioconservazione e tecnologie di riproduzione assistita (ART)

La crioconservazione è di cruciale e crescente importanza in medicina riproduttiva. Dalla metà degli anni 1980, la crioconservazione e la conservazione di embrioni umani derivanti da tecniche di riproduzione assistita è stata utilizzato al fine di evitare il trasferimento simultaneo di più embrioni senza perdere questo prezioso materiale biologico umano. Negli ultimi dieci anni, questo approccio ha contribuito a guidare la pratica verso il trasferimento di un singolo embrione e di conseguenza consentendo di ridurre drasticamente gravidanze multiple in molti paesi. Il successo clinico ottenuto da embrioni crioconservati ha stimolato embriologi e criobiologi a perseguire in questa direzione. La sfida dei ricercatori non solo nella direzione di fornire il metodo più valido per la crioconservazione embrionaria a diversi stadi (2PN, stadio di segmentazione, stadio di blastocisti), ma anche di sviluppare un metodo per la criopreservazione di ovociti umani. Questa esigenza è stata guidata dal desiderio di preservare la fertilità nelle giovani pazienti oncologiche in procinto di sottoporsi a trattamenti gonadotossici e anche da una legislazione restrittiva che, in alcuni paesi, vietava la crioconservazione degli embrioni.

Infine, negli ultimi anni, la medicina della riproduzione ha intuito come la crioconservazione ovocitaria potrebbe essere una procedura chiave per il successo nei programmi di ovodonazione. La formazione di banche con ovociti crioconservati in grado di dare ai pazienti, agli embriologi ed ai medici, maggiori alternative terapeutiche, era stato per diversi anni uno scenario utopico. In primis il motivo è stato che la crioconservazione di ovociti allo stadio di metafase II (MII) considerata metodologia inefficiente, solo successivamente è stato apprezzata come presupposto per il progresso della scienza nell'ambito della preservazione della fertilità. L'introduzione della vitrificazione come tecnica principale per la criopreservazione ha completamente cambiato la prospettiva, migliorando notevolmente i risultati clinici.

VITRIFICAZIONE IN P.M.A. (PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA)

Vitrificazione è il fenomeno fisico che avviene quando non si verifica la solidificazione di una soluzione mediante cristallizzazione di ghiaccio, ma da un aumento della viscosità si raggiunge una consistenza vetrosa, molto simile a quella del vetro (69). È un metodo di crioconservazione di cellule e tessuti.

In primo luogo è stata descritta nel 1938 (70), quando i primi studiosi riportarono la crioconservazione di spermatozoi di rana. Nei mammiferi, la prima procedura di crioconservazione con successo è stata ottenuta nel 1949 con il congelamento lento di spermatozoi con l'utilizzo glicerolo come crioprotettore (71). La vitrificazione è stata applicata all'embriologia quarant'anni dopo in embrioni di topo (22). Gli ovociti sono stati vitrificati con successo nel 1991 (72). È interessante notare che la sua applicazione nel campo delle tecnologie di riproduzione assistita è stata limitata fino a poco tempo fa. Per molti anni, il raffreddamento lento risultò essere l'opzione principale per ovociti crioconservati ma con scarso successo (73,74). A causa di questi risultati, la crioconservazione ovocitaria fu considerata come una tecnica sperimentale ed adoperata in casi di emergenza ed in cui preservare la fertilità delle donne, come nelle pazienti oncologiche prossime a trattamenti gonadotossici. Recentemente, la vitrificazione ha dimostrato essere uno strumento molto utile, dando ottimi risultati in termini di sopravvivenza ed outcome clinici al contrario dei protocolli a lento raffreddamento (75,39,76).

Conservazione della fertilità

La preservazione della fertilità nelle pazienti oncologiche in età riproduttiva è un aspetto di crescente interesse da parte della comunità scientifica in particolare con riferimento alle diverse opzioni di trattamento e prospettive di congelamento ovarico e tissutale. Nei paesi occidentali circa 1 su 10.000 donne in età riproduttiva è affetta da una malattia tumorale. Leucemie, linfomi, tumore del sistema nervoso centrale, mammella, tumore cervicale sono le forme più comuni di cancro. Al giorno d'oggi, le giovani pazienti oncologiche hanno buona prognosi di sopravvivenza alla malattia grazie alla diagnosi precoce e al miglioramento dei trattamenti disponibili. Tuttavia, a causa dei trattamenti chemio e radioterapici le pazienti subiscono danni irreversibili al loro patrimonio ovarico e gametico. In tal modo sono anche maggiormente esposte e predisposte a disturbi mestruali, insufficienza ovarica precoce (POI) e menopausa precoce (POF) che portano ad un'alta probabilità di sub o completa infertilità. La radioterapia addominale induce un danno ovarico in modo dose-dipendente, mentre l'irradiazione totale del corpo è stato evidenziato causare insufficienza ovarica prematura (POI) nel 97% dei casi segnalati (77). La somministrazione di chemioterapia può causare la perdita del patrimonio follicolare ovarico e portare a deficit ormonali ed infertilità (78).

Oltre alla possibilità di crioconservazione degli embrioni al fine di preservare la fertilità in questi pazienti, esistono tre opzioni principali. L'ablazione della corteccia ovarica e successiva crioconservazione di tessuto ovarico con successivo autotrapianto, unica strategia per le ragazze in età pre-puberale ed ancora considerato un approccio sperimentale con risultati limitati, e la vitrificazione degli ovociti post minima stimolazione ovarica ad oggi tecnica di grande ausilio per questa categoria di pazienti. Questa tecnica non presenta il rischio di trasmissione di cellule tumorali come per l'autotrapianto della corticale ovarica e ciò costituisce uno dei principali vantaggi di questa metodica. La terza opzione è quella di combinare le due tecniche.

Oltre al cancro, ci sono più malattie che includono il trattamento con chemio e radioterapia. Nelle malattie autoimmuni, come nelle malattie reumatiche autoimmuni sistemiche e nelle malattie ematologiche, è necessaria la terapia con ciclofosfamide (79). Inoltre, ci sono indicazioni mediche non oncologiche per il congelamento ovocitario come l'endometriosi severa sintomatica. In questi pazienti l'effetto deleterio dei processi infiammatori cronici sulla riserva ovarica e sulla qualità ovocitaria durante gli anni può

essere aggirato con questa metodica (80). Predisposizioni genetiche che portano a rischio di perdita della fertilità in giovani come nel caso del mosaicismo della sindrome di Turner costituisce un'altra opzione al trattamento (81).

Nella routine quotidiana FIV (in vitro fertilization), la crioconservazione ovocitaria bypassa le problematiche mediche o psicologiche che non rendono possibile la disponibilità di seme maschile il giorno del pick-up ovocitario. In passato, 8h dopo il pick up gli ovociti recuperati venivano eliminati e quindi persi a causa del loro processo di invecchiamento. Oggi abbiamo la possibilità di vitrificarli e quindi fecondarli nel momento più opportuno. Il congelamento ovocitario può anche essere considerata un'opzione nelle pazienti poor - responder ovvero una particolare categoria di pazienti con scarsa risposta ovarica. (82).

La vitrificazione degli ovociti per ragioni etiche e sociali

Ci sono coppie con obiezioni morali o religiose circa la crioconservazione degli embrioni. Inoltre, alcuni paesi hanno restrizioni di legge per quanto riguarda la loro crioconservazione. Allo stesso modo, gli stessi paesi consentono la crioconservazione di ovociti eccedenti che derivano da stimolazione ovarica. (83). Una recentissima applicazione alla crioconservazione ovocitaria è il " Social Freezing" (84). Per molte donne il passare del tempo, motivazioni sociali ed economiche, nega loro la possibilità di diventare madri in età relativamente giovani costringendole a ritardare la programmazione di una famiglia anche oltre i quarant'anni di età. Epoca in cui si assiste ad una riduzione del tasso di fecondità ed aumento dei tassi di aborti spontanei oltre che un aumento del rischio di avere un bambino con anomalie cromosomiche come la sindrome di Down. Crio-preservando i propri ovociti in giovane età, le donne hanno la possibilità di rinviare la propria maternità al momento più opportuno.

Vitrificazione ovocitaria in programmi di ovodonazione

La donazione di ovociti è diventata una tecnica applicata frequentemente in tecnologia di riproduzione assistita (ART). Le principali indicazioni all'ovodonazione sono POF (premature ovarian failure), malattie genetiche ereditarie materne, menopausa, poor responders e pazienti con fallimento di impianto ricorrente in cicli di fecondazione in vitro. Fallimenti d'impianto potrebbero essere collegati ad anomalie genetiche, come le traslocazioni cromosomiche o disfunzioni dell'apparato del fuso che porta a una elevata incidenza di aneuploidie negli ovociti.

Sempre più donne ad oggi accedono ad un programma di ovodonazione a causa dell'età avanzata. L'ovodonazione ha sempre prodotto i più alti tassi di gravidanza tra tutti i metodi di riproduzione assistita, fondamentalmente per via della selezione di ovociti da giovani donatrici sane.

La donazione di ovociti richiede la sincronizzazione ormonale del ciclo mestruale del donatore e del ricevente. Al fine di soddisfare le elevate esigenze di ovodonazione e il grande sforzo logistico, la vitrificazione offre la migliore opzione per la creazione di banche per ovociti. Grazie alla crioconservazione la necessità di sincronizzazione donatore / ricevente viene superata. Inoltre possono essere svolti con facilità la logistica e gli screening (85) infettivologici delle donatrici per eventuali malattie trasmissibili.

LA TECNICA

La procedura di vitrificazione / riscaldamento degli ovociti si compone di 5 fasi:

1. Esposizione di gameti alle soluzioni di crioprotettori (CP)
2. Caricamento su supporto ed immersione in LN2
3. Stoccaggio (storage) in contenitori con LN2
4. Estrazione del vettore dalla cannuccia protettiva e riscaldamento delle cellule
5. Diluizione della concentrazione di crioprotettore intracellulare (CP)

1. Esposizione a soluzioni di crioprotettori

Le alte concentrazioni di CP e percentuali di raffreddamento / riscaldamento estremamente rapide sono due condizioni che supportano la formazione di uno stato simile al vetro. Indipendentemente dal dispositivo portante, la chiave del successo è quello di trovare l'equilibrio ottimale tra la velocità di raffreddamento e riscaldamento e le condizioni minime e ottimali di esposizione alle alte concentrazioni di CP necessarie per ottenere e mantenere un microambiente intracellulare vitrificato e non tossico (75). Ciò significa che il successo dei protocolli di vitrificazione dipende da un'ottimale disidratazione cellulare e penetrazione di CP quando esposti a soluzioni ipertoniche.

La permeabilità e la modalità d'ingresso dell'acqua e dei CP attraverso la membrana cellulare, i cambiamenti durante le diverse fasi di sviluppo e la dimensione e morfologia cellulare sono aspetti importanti che devono essere presi in considerazione nella creazione di un protocollo di vitrificazione.

Immergendo il materiale biologico in LN2, le cellule sono esposte a CP con lo scopo di creare un ambiente intracellulare che rimane vitrificato ad un tasso di raffreddamento e riscaldamento definito. Per raggiungere questo obiettivo, quasi tutti i metodi di vitrificazione prevedono l'esposizione del materiale biologico ad un minimo di due

passaggi a concentrazioni gradualmente crescenti di soluzioni di non vitrificazione (NVS) e di vitrificazione (VS). NVS è composto esclusivamente da CP permeabile. Al contrario, nel VS esiste la possibilità di utilizzare CP non permeabile sia con basso che alto peso molecolare.

Gli ovociti vengono prima esposti ad una o più NVS. Durante questa fase, una certa quantità di CP entra nelle cellule. Il tempo di esposizione al NVS avviene ad una temperatura definita (T°) ed è di grande importanza determinando la quantità di CP intracellulare. Essa può variare tra 3 e 15 minuti a seconda del tipo di CP e del tipo e stadio di sviluppo del materiale biologico. La durata dell'esposizione ai CP permeabili è determinata da diversi fattori biofisici come le proprietà di membrana (permeabilità cellulare all'acqua e CP), il tipo e la concentrazione di CP, il rapporto superficie/volume delle cellule e le velocità di raffreddamento e riscaldamento (49,87,88).

In ultima fase, il materiale biologico è esposto per un breve periodo al VS. Una condizione di vitrificazione intracellulare è ottenuta grazie alla disidratazione di embrioni in VS che concentra le soluzioni intracellulari di sali, proteine e CP che hanno penetrato la cella in corso di esposizione a NVS. Questa strategia genererà un ambiente intracellulare che è compatibile con uno stato vetroso quando le cellule vengono direttamente immerse in LN2. Lo stato di vitrificazione extracellulare è ottenuto dalla concentrazione di CP nella VS che incapsula l'embrione in una guaina di vitrificazione.

2.Caricamento su dispositivo carrier, immersione in LN2.

Dopo la loro esposizione a crioprotettori, gli ovociti devono essere posizionati ad un dispositivo per le procedure di raffreddamento e stoccaggio in serbatoi di LN2. Esistono due tipi di dispositivi per la vitrificazione di ovociti: *dispositivi aperti e chiusi*.

I dispositivi aperti sono costituiti da un vettore in cui il materiale viene caricato. Lo stesso vettore immerso in LN2 e gli ovociti posti in contatto diretto con essa. Questo contatto diretto con LN2 produce una velocità di raffreddamento piuttosto alta ($> 20.000 \text{ }^\circ\text{C}$), condizione fondamentale per conseguire la vitrificazione.

I dispositivi chiusi, come quelli aperti, presentano anch'essi un vettore che conterrà gli ovociti ed una parte esterna che racchiuderà il vettore ermeticamente chiusi. La parte esterna è solitamente una cannucchia ad alta sicurezza. Quindi il dispositivo di chiusura

(carrier e cannuccia) contenente gli ovociti sarà immerso in LN2 e conseguentemente gli ovociti non sono in contatto con LN2 durante la procedura di raffreddamento. Per molti scienziati questo tipo di isolamento fornito dal sistema chiuso al materiale biologico è di grande rilevanza. Per altri, invece, le velocità di raffreddamento che vengono generati nei sistemi chiusi, significativamente inferiori (circa 2.000 ° C) generano un grande scetticismo.

Il caricamento degli ovociti sui vettori viene eseguito per mezzo di un piccolo volume di soluzione VS. Come accennato precedentemente il volume della vitrificazione svolge un ruolo importante nel processo stesso. Minore è il volume più facile è la formazione di uno stato vetroso.

3.Stoccaggio degli ovociti in LN2

Come accennato in precedenza, gli ovociti durante la procedura di raffreddamento vengono posti in dispositivi carrier. Dopo essere stati immersi in LN2, questi vettori vengono trasferiti in grandi contenitori che sono pieni di LN2. Gli ovociti possono essere conservati in questi contenitori da pochi mesi a diversi anni, purché tali contenitori vengano riempiti con LN2 periodicamente. Ovociti vitrificati con un sistema aperto saranno costantemente in contatto con LN2 durante il periodo di conservazione. Ovociti vitrificati con metodica closed, invece, isolati da LN2 del contenitore in cui immersi.

4.Procedura di riscaldamento

Il tasso di raffreddamento è sempre stato considerato come la condizione più critica per un'ottimale procedura di vitrificazione. È sorprendente quanta poca attenzione è stata data inizialmente alla procedura di riscaldamento dato che appare evidente come il tasso di riscaldamento svolga un ruolo essenziale per non dire più importante del raffreddamento in termini di sopravvivenza.

Un alto tasso di riscaldamento protegge lo stato vitreo da un'eventuale ricristallizzazione durante la fase di riscaldamento (89,90). Infatti, durante il processo di riscaldamento, le cellule prima devitrificano quando riscaldate al di sopra della temperatura di transizione vitrea. Se il tasso di riscaldamento non è abbastanza veloce, il liquido altamente refrigerato si trasforma con grande velocità in piccoli cristalli di ghiaccio. A percentuali di

riscaldamento troppo basse, i piccoli cristalli di ghiaccio sono soggetti a fenomeni di ricristallizzazione che può avere conseguenze letali.

È noto che per ogni concentrazione di crioprotettori i tassi di riscaldamento sono molto superiori ai tassi di raffreddamento (91). Di conseguenza, la concentrazione minima di CP per evitare la cristallizzazione durante il riscaldamento deve essere superiore rispetto a quella del raffreddamento. Ciò significa che potrebbe essere più facile mantenere uno stato vitreo durante il raffreddamento che durante il processo di riscaldamento per la stessa concentrazione di CP. Se il tasso di riscaldamento è ridotto utilizzando dispositivi che separano la goccia contenente gli embrioni, saranno necessarie elevate concentrazioni intracellulari di CP per ridurre la probabilità di ricristallizzazione. Tuttavia elevate concentrazioni di CP potrebbero essere tossiche per le cellule. Pertanto, al fine di non aumentare troppo le loro concentrazioni, il materiale biologico deve essere riscaldato rapidamente.

Dunque, al fine di raggiungere questi tassi di riscaldamento, un contenitore di LN2 contenente i dispositivi è posto vicino ad una stereomicroscopio. Il vettore con gli ovociti viene trasferito da LN2 ad un piatto con volume adeguato (almeno 0,5ml) di soluzione di riscaldamento, ed al fine di raggiungere tassi di riscaldamento ancora più elevati, la soluzione di riscaldamento viene preriscaldata a 37 °C

5. Diluizione dei crioprotettori

Durante il riscaldamento dell'acqua le cellule ed i CP vengono lavati. Ciò deve essere eseguito in modo controllato per evitare danni cellulari. Un eccessivo afflusso di acqua è superato da una esposizione graduale a soluzioni contenenti ridotte concentrazioni di saccarosio.

DISPOSITIVI DI VITRIFICAZIONE APERTI E CHIUSI

Sono due le categorie di dispositivi di vitrificazione facilmente distinguibili: sistemi aperti e chiusi. La differenza principale risiede nel consentire o non il contatto diretto con l'azoto liquido (tipico dei primi).

Il principio base della vitrificazione in criobiologia è quello di eliminare il rischio di formazione di ghiaccio nei medium contenenti il campione durante il raffreddamento, lo stoccaggio e il riscaldamento (22). Ciò può essere ottenuto sia da un aumento dei tassi di raffreddamento e riscaldamento sia da un aumento della concentrazione di crioprotettori. In pratica, entrambi gli approcci vengono applicati. Più alta è la concentrazione di crioprotettore minore è la velocità di raffreddamento richiesta e viceversa. Tuttavia, è stato osservato come i crioprotettori possano causare tossicità nonché lesioni osmotiche. Pertanto, la strategia migliore risulta essere quella di utilizzare i tassi più elevati possibili di raffreddamento e riscaldamento ed applicazione di basse concentrazioni di CP tali da garantire sicurezza e solidificazione senza formazione di ghiaccio (48,75,83).

Soluzioni con volume piccolo e la sua diretta esposizione ad azoto liquido possono (Figure 3-3.1) potenzialmente costituire il modo migliore per raggiungere elevati tassi di raffreddamento e riscaldamento (figura 4.3). Questa esposizione diretta con LN₂ è ciò che distingue il sistema aperto (figure 4,4.1-4.2) dal chiuso e produce una grande differenza nella velocità di raffreddamento dei protocolli di vitrificazione aperti (> 25.000 ° C / min) a confronto con i chiusi (<2.000 ° C / min).

Questa riduzione nella velocità di raffreddamento è responsabile di un dibattito ancora in corso soprattutto per la vitrificazione di ovociti così come la velocità di raffreddamento è ampiamente considerata un fattore importante per il successo dei protocolli di congelamento e che per questo ancora alcuni sostengono che i sistemi aperti dovrebbero essere usati per materiali biologici sensibili come gli ovociti MII (92).

L'azoto liquido è solitamente non sterile e, probabilmente, contenente agenti patogeni. Inoltre, potenzialmente vi ritroviamo al suo interno composti chimici reattivi. Gli embrioni e gli ovociti vitrificati disposti su questi carrier "aperti" sono direttamente esposti a LN₂

durante il raffreddamento e le cannucce sono chiuse solo in LN2 implicando un livello costante di LN2 nella cannuccia stessa.

Uno svantaggio di questa strategia è il contatto diretto del materiale biologico con LN2 durante il raffreddamento e durante tutta la fase di stoccaggio. Anche se la questione della contaminazione da batteri, virus o funghi durante il raffreddamento e la conservazione nei LN2 è ancora in discussione, la potenziale probabilità di contaminazione solleva certamente problemi di sicurezza (93,94). Vari metodi sono stati proposti per la sterilizzazione di LN2, tra cui filtri ceramici (95) o luce UV contemporaneamente ad una crioconservazione ermetica (96) ma tecnicamente complessi e costosi. Anche la conservazione nel vapore con LN2 è stata proposta come valida alternativa ma anch'essa segnalata come potenziale fattore di rischio per la trasmissione di patogeni (97). Inoltre, le variazioni di temperatura all'interno del vapore potrebbero mettere a rischio la sopravvivenza dei gameti e degli embrioni crioconservati.

Anche quando l'esposizione al materiale infetto nel punto di vitrificazione è evitato utilizzando LN2 sterilizzato e l'eventuale contaminazione venga evitata utilizzando serbatoi con vapore, la costante esposizione al LN2 all'interno dei dispositivi di vitrificazione aperti comprendenti i composti reattivi a basso peso molecolare permane (98). Anche se la probabilità di deterioramento delle strutture cellulari dal contatto con LN2 è ancora in discussione, questo rischio è importante e indica che il sistema di conservazione in particolare nel lungo termine deve essere modificato. I composti chimici reattivi contenuti in LN2 potrebbero indurre lesioni biofisiche dei campioni crioconservati. Metodi per sterilizzare l'LN2 prima del contatto con i gameti o gli embrioni con luce UV potrebbe inoltre provocare la produzione di composti reattivi, che porta a sua volta ad un aumentato rischio di danni a causa delle proprietà fisiche e chimiche del LN2 irradiato.

Tuttavia, anche in condizioni di conservazione standard o in serbatoi e ogni qualvolta le cannucce vengano inserite o rimosse esso pone comunque un rischio di possibile miscelazione dell'ossigeno proveniente dall'aria circostante con LN2.

Anche se generalmente accettato che le reazioni termiche non si verificano in cellule a -196 °C, è stato riportato che, nel caso di radiazione di una miscela LN2 / ossigeno la sintesi di radicali dell'ossigeno risultanti dalla formazione e decomposizione di ozono non può essere esclusa e per di più coadiuvata dall'effetto catalitico dell'azoto. Una recente pubblicazione riporta che ovociti di topo mostrano tassi sopravvivenza, di fertilizzazione e sviluppo embrionale compromessi dopo il contatto prolungato con LN2 (98). Pertanto,

anche la prevenzione di contaminazione incrociata nei serbatoi per lo stoccaggio di cannuce in vapore di azoto potrebbe non proteggere sufficientemente i campioni.

Il rischio teorico di contaminazione incrociata in contenitori LN2 anche a -196° è stata ampiamente dibattuta (99). A tal proposito, è stato proposto un sistema ermeticamente chiuso, che garantisca condizioni ottimali di stoccaggio (100). L'isolamento di embrioni all'interno di una cannuccia *chiusa* garantisce la sicurezza contro la contaminazione ed eventuali rischi da LN2 e la conservazione a lungo termine.

La direttiva europea (2004/23 / CE) (101), così come con le direttive FDA sulla conservazione di tessuti e le cellule (102) impone per la crioconservazione di cellule e tessuti di aderire a certe norme di sicurezza, assicurando che gameti ed embrioni siano protetti da qualsiasi possibile contaminazione di agenti patogeni al fine di evitare eventuali condizioni fisiche nocive durante la conservazione. Al fine di esservi in accordo, una valida alternativa consiste nel passare da un dispositivo di trasporto a vitrificazione aperta ad un protocollo che comporta l'isolamento completo dei campioni biologici sia durante il processo di raffreddamento che stoccaggio isolando ermeticamente gli embrioni da LN2.

Figura 3

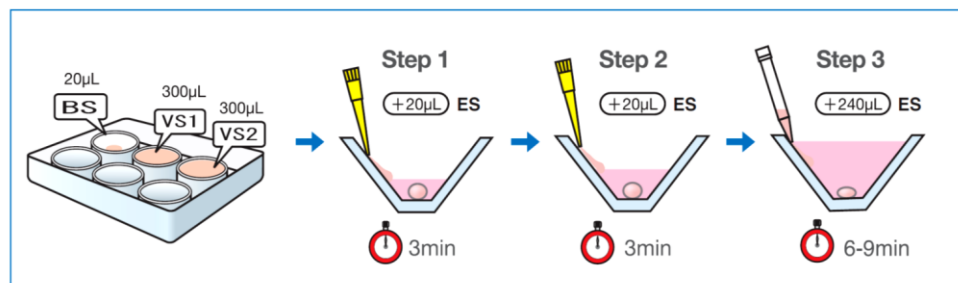
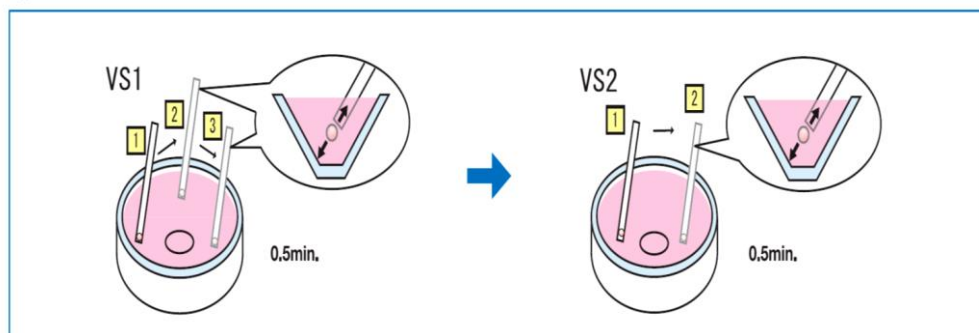
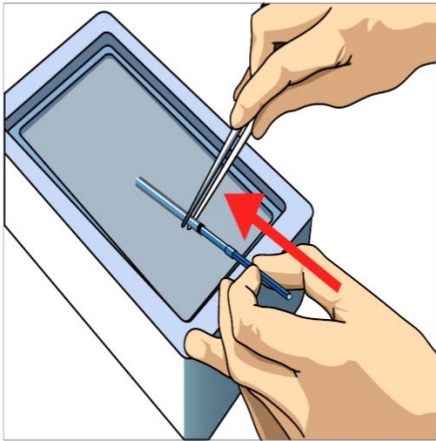


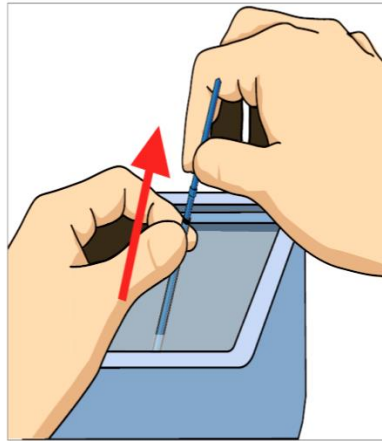
Figura 3.1



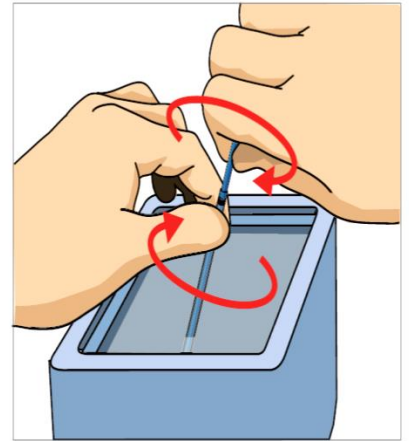
(Figure 3-3.1-Steps vitrificazione con open system)



Hold the straw cap with tweezers and insert the Cryotop into it.



Hold the straw cap with fingers and fit it.



Twist it and make sure if the straw cap fits tightly to the Cryotop.

Figura 4

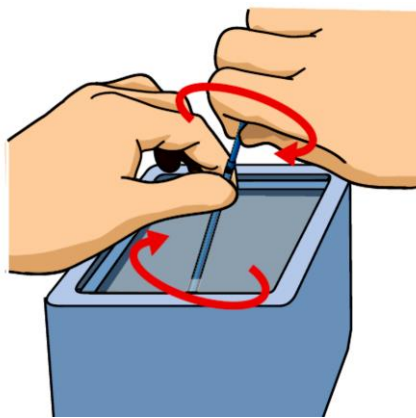


Figura 4.1

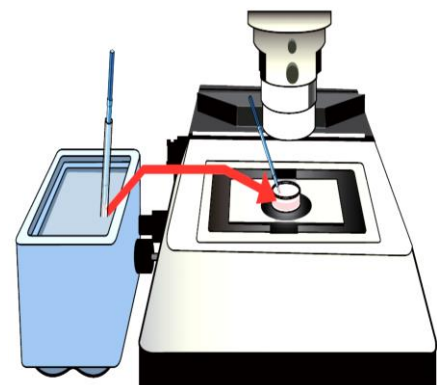


Figura 4.2

(Figure 4-4.1-4.2- Steps vitrificazione con open system)

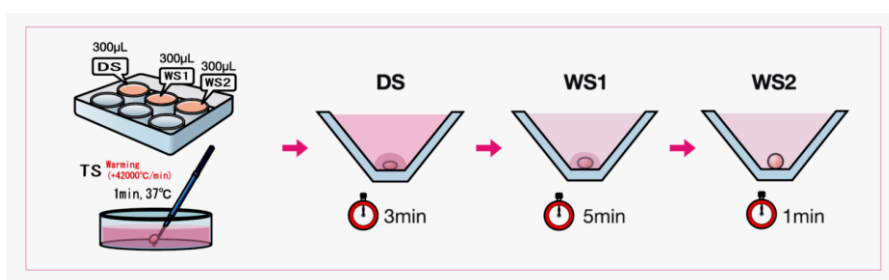


Figura 4.3. Fasi di riscaldamento in open system

Outcomes perinatali, neonatali ed epigenetici

Gli ovociti non solo trasmettono informazioni genetiche per gli embrioni in via di sviluppo, ma anche trasmettono loro energia, nutrienti ed un genoma mitocondriale. Un'alterata espressione dell'informazione genetica potrebbe essere causata da difetti nel DNA, proteine-istoni, sistema citoscheletrico, sistema di riparazione del DNA e dei sistemi che regolano l'espressione genica (trasduzione, trascrizione, ecc.). Le uova della maggior parte delle specie sono cellule giganti, contenenti set di tutti i materiali necessari per lo sviluppo dell'embrione fino alla fase di impianto nei mammiferi. Le uova sono tipicamente sferiche o ovoidali, con un diametro di 100 μ m nell'uomo e ricci. Una tipica cellula somatica, invece, ha un diametro di soli 10 o 20 μ m. L'uovo contiene tipicamente riserve nutritive sotto forma di tuorlo, che è ricco di lipidi, proteine, polisaccaridi, granuli corticali, mitocondri, mandrini, microtubuli e microfilamenti. Il maggior contenuto di lipidi è importante ai fini della crioconservazione, dal momento che potrebbe influenzare l'efficienza di questo processo (103). Un'altra caratteristica distintiva dell'uovo è il suo mantello o guscio, che è una matrice extracellulare specializzata e composta principalmente da molecole glicoproteiche, alcuni secreti dell'uovo e delle cellule circostanti. Il volume del nucleo, altamente idratato, è molto più grande negli ovociti che nelle cellule somatiche. Queste peculiarità rende gli ovociti diversi da altre cellule ed ha creato qualche difficoltà nella criobiologia applicata.

Alcuni anni fa, l'efficienza della crioconservazione ovocitaria era piuttosto bassa nella maggior parte delle specie; il tasso di gravidanza riportato per ovocita scongelato post congelamento lento negli esseri umani fino al 2005 è stato del 2,3% (104). L'introduzione della vitrificazione ha fornito risultati promettenti con un tasso di sopravvivenza del 96,7% ed un tasso di gravidanza del 65,2% per embryo transfert (ET) (76) e parametri di riferimento più rassicuranti (105). I progressi nella criobiologia divennero così pronunciati che in alcuni centri, gli autori sostengono come ovociti vitrificati presentino le stesse qualità di quelli freschi. Un trial clinico randomizzato controllato in un unico centro non è riuscito a dimostrare la superiorità di utilizzare ovociti freschi rispetto ai ovociti vitrificati in termini di percentuali di gravidanze in corso in programmi di ovodonazione (106). Il numero delle nascite derivanti da ovociti umani vitrificati è stato di 800 nel 2009 (104). Questo numero è aumentato negli anni successivi ed il report di un singolo centro riferisce la nascita di almeno 1027 neonati (107); tuttavia, in letteratura non è riportata la stima mondiale dei bambini nati fino ad oggi.

PARTE 2

NOSTRA ESPERIENZA

La crioconservazione di ovociti è stata considerata una procedura sperimentale fino a poco tempo fa (108). Quando abbiamo iniziato ad ideare questo progetto di ricerca, la crioconservazione degli ovociti era ancora del tutto concepita come tecnica di routine nei laboratori di fecondazione in vitro. E la crioconservazione ovocitaria utilizzata solo in casi di emergenza, quando nessun'altra opzione fosse ipotizzabile. Per esempio, nelle pazienti oncologiche prossime a trattamenti terapeutici d'emergenza (chemio-radioterapia), dove l'unica alternativa possibile al fine di preservare la loro fertilità risultasse essere il congelamento ovocitario. Un'altra condizione che indirizza verso la crioconservazione è l'imprevista mancanza di campione seminale maschile il giorno del pick up ovocitario nelle procedure di in vitro fertilization (IVF). Inoltre, vi sono paesi in cui la giurisdizione e/o motivazioni morali non permettono la formazione di molti embrioni per ciclo di fecondazione in vitro. Pertanto, dopo il pick up ovocitario, si è costretti alla fecondazione di un massimo di tre ovociti ed i restanti vengono crioconservati. Come accennato in precedenza, i primi risultati clinici da crioconservazione ovocitaria furono molto bassi. Nella concezione comune di quel momento storico, aderire ad un programma di crioconservazione era considerato un fallimento clinico.

La ragione principale degli scarsi risultati embriologici e clinici è stato il fatto che il congelamento lento rimaneva ancora la tecnica preferita per la crioconservazione. La prima crioconservazione di ovociti non fecondati fu riportata alla fine degli '80, rivelandosi una delle più grandi sfide nel campo della criobiologia riproduttiva umana dato anche il fatto che i protocolli rimasero inefficaci per più di 25 anni (109) ed i risultati clinici molto bassi. L'introduzione della vitrificazione come tecnica potenzialmente efficace per la criopreservazione di embrioni umani (39) ha sicuramente migliorato le nostre conoscenze su questa tecnica anche a livello clinico. Per di più i primi esiti positivi dopo procedure di vitrificazione e successivo riscaldamento di embrioni hanno portato i ricercatori a testarne l'efficienza in ovociti umani. Nel 2005 e nel 2007 sono stati riportati outcome biologici e clinici accettabili dall'utilizzo di ovociti umani vitrificati (35,39). Tuttavia, la criopreservazione ovocitaria non era ancora considerata una tecnica sicura a causa del basso rapporto superficie/volume dell'ovocita, condizione che rende difficile il raggiungimento della sopravvivenza di questa cellula.

La metodica utilizzata nei primi studi clinici per ovociti umani criopreservati è sempre stata la tecnica a sistema aperto. Come accennato in precedenza, in questo metodo il materiale biologico è in contatto diretto con LN2. Questo contatto diretto con azoto liquido garantisce il principio fondamentale per il raggiungimento di una buona vitrificazione, ovvero l'elevata velocità di raffreddamento. Pertanto, si comprende facilmente come la rapida velocità di raffreddamento sia la peculiarità più importante per embrioni e cellule umane criopreservate senza arrecare danno agli stessi e pertanto considerata la tecnica di scelta rispetto al congelamento lento.

Tuttavia, negli ultimi dieci anni, un certo scetticismo si è diffuso sull'utilizzo della vitrificazione con sistema open. Tra le motivazioni riportate la possibile trasmissione e contaminazione incrociata da un campione all'altro in azoto liquido (93). Anche se questa possibilità è discutibile, il Consiglio europeo ha pubblicato una linea guida che detta l'utilizzo del metodo più sicuro per la crioconservazione e lo stoccaggio di materiale biologico umano (101) e questa direttiva ha portato gli scienziati a introdurre sistemi chiusi per ovociti ed embrioni umani.

Tuttavia, l'utilizzo di sistemi chiusi per la vitrificazione non è l'opzione preferita nei laboratori di IVF. A causa del termo-isolamento, la velocità di raffreddamento nel sistema chiuso (2000°C) è significativamente inferiore rispetto all'aperto (> 20.000°C). Sulla base di ciò, il sistema chiuso viene considerato come tecnica meno efficiente per la criopreservazione di embrioni umani ed ancor meno per ovociti umani che risultano essere generalmente più difficili da vitrificare.

Molta attenzione è stata dedicata alle procedure di congelamento, trascurando in parte la fase di riscaldamento. E' nel 2008 e nel 2009 che l'importanza dei tassi di riscaldamento vengono segnalati come più significativi dei tassi di raffreddamento da due noti criobiologi (89,90). Il loro lavoro ha indicato la possibilità di ottenere un ottimale vitrificazione utilizzando tassi di raffreddamento inferiori pur mantenendo tassi di riscaldamento elevati. Ciò significa che le velocità di raffreddamento che si ottengono dal sistema chiuso sono abbastanza adeguate per un'idonea vitrificazione ed allo stesso tempo per evitare la formazione di cristalli di ghiaccio nocivi all'interno delle cellule.

L'obiettivo principale del nostro lavoro è stato quello di confrontare: a) sistema aperto vs chiuso (asettico) nonché b) outcome clinici e biologici di ovociti freschi vs ovociti vitrificati con metodica closed.

La principale implicazione dello studio è stata quella di dare una risposta ad un dibattito ancora in corso: possiamo utilizzare in modo sicuro, con successo e di routine un sistema chiuso come metodica standard di vitrificazione di ovociti?

Ai fini di questa tesi:

- A. Abbiamo istituito una serie di esperimenti al fine di determinare il miglior protocollo per riscaldamento e reidratazione degli ovociti
- B. Abbiamo istituito una sperimentazione clinica al fine di confrontare ovociti vitrificati con metodo chiuso vs ovociti freschi.

MATERIALE E METODI

Tutti gli esperimenti e gli studi clinici hanno avuto luogo tra gennaio 2014 e settembre 2016 presso il Fertility Center IAKENTRO in Salonicco. Gli ovociti utilizzati per i nostri scopi scientifici erano tutti provenienti da programmi di ovodonazione. Il vantaggio di utilizzare ovociti donati è la nota qualità del materiale biologico in quanto prelevati da giovani donatrici sane e di comprovata fertilità eliminando ogni fattore di compromissione sui potenziali risultati.

Al fine di determinare il protocollo più appropriato per la crioconservazione ovocitaria, abbiamo applicato diverse concentrazioni e tempi di esposizione dei CP agli ovociti donati ed immaturi 2h dopo il prelievo ovocitario (pick up) e quindi non utilizzabili nel programma di ovodonazione. Questi ovociti sono stati lasciati maturare in vitro da 12 a 24 ore e quindi utilizzati come materiale sperimentale. Formulato il protocollo di vitrificazione / riscaldamento, esso è stato utilizzato per ovociti donati e dove applicabile la crioconservazione. Al fine di trovare risposta alla nostra ricerca iniziati due studi clinici prospettici. Utilizzati ovociti maturati 2h dopo il loro pick up. Gli ovociti sono stati vitrificati, riscaldati e donati ad una corrispettiva ricevente aderente ad un programma di ovodonazione.

Caratteristiche delle donatrici

Effettuata una dettagliata anamnesi delle donatrici. Tutte con età ≤ 32 anni, BMI <30 kg / m², cicli mestruali regolari (25-35 giorni), ovaie normali e valutate mediante scansione transvaginale. Assenza di sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), endometriosi o altre patologie mediche e ginecologiche. Le stesse hanno volontariamente deciso di donare i propri ovociti per il trattamento in forma anonima e tutte di buona fertilità e risposta ovarica. Effettuate a tutte le pazienti screening ematici, del cariotipo e per le infezioni virali (epatite B e C, HIV, sifilide, talassemia e fibrosi cistica).

Caratteristiche delle riceventi

Le riceventi ed i loro partner sono stati sottoposti a screening ematici identici alle donatrici, mentre un'isterosalpingografia (ISG) ed un'isteroscopia diagnostica effettuate per escludere casi con eventuale idrosalpinge o patologia intrauterina. A tutte effettuato un embryo transfert (ET) di prova in un ciclo precedente quello dell'ovodonazione e se riscontrata difficoltà all'accesso effettuata una dilatazione propedeutica (110).

In entrambi i gruppi, le coppie destinatarie non presentavano alcuna condizione d'infertilità maschile. Tutti i partner maschili delle coppie presentavano valori nemaspermici in riferimento alla concentrazione, motilità e morfologia. Utilizzati i criteri WHO (111) per valutare la qualità del liquido seminale.

Stimolazione ovarica donatrici

Per la stimolazione ovarica delle donatrici è stato adoperato un protocollo con antagonista del GnRH fisso al 6° giorno del ciclo mestruale. La stimolazione iniziata con somministrazione giornaliera di 225U.I. di rFSH (ormone ricombinante follicolo stimolante) dal 2° giorno del ciclo. I cicli sono stati monitorati mediante ecografia transvaginale e valutazione dei livelli sierici di estradiolo (E2), iniziando il secondo giorno del ciclo mestruale e ripetuti dopo 3 giorni di stimolazione. La dose giornaliera di rFSH è stata regolata in base alla risposta ovarica della donatrice, sulla base dei livelli sierici di estradiolo ed in correlazione con il numero e le dimensioni dei follicoli ovarici. Per evitare il picco di LH precoce il protocollo prevedeva la somministrazione giornaliera di GnRH antagonista (Orgalutran 0,25 mg; NV Organon) a partire dal pomeriggio del 6 °giorno di stimolazione. Se al monitoraggio ovarico riscontrati 3 o più follicoli del diametro ciascuno > 17 millimetri e livelli sierici di estradiolo > 1500pg /ml, somministrati 10.000 U.I. di hCG (gonadotropina corionica umana) (hCG - Pregnyl; NV Organon).

Alle donatrici identificate a rischio di iperstimolazione ovarica (OHSS) effettuato il giorno prima della somministrazione di hCG una doppia somministrazione (mattina e sera) con antagonisti (112). Non effettuata somministrazione di GnRH antagonista il giorno della somministrazione di hCG.

Preparazione endometriale riceventi

Pazienti con regolare funzionalità ovarica sono state sottoposte ad una down-regulation in fase luteale con una singola dose di GnRH- agonista depot (Arvekap 3,75mg) a partire dal 21° giorno del ciclo precedente. Il giorno dopo la certezza della donatrice adeguatamente preparata, le pazienti riceventi informate della necessità di iniziare l'assunzione di estradiolo valerato (Cyclacur o Progynova,) 2 mg al giorno per i primi 4 giorni, 4 mg al giorno per i giorni 5-8 e 6 mg al giorno fino a test di gravidanza positivo.

Il pomeriggio del pick up (donatrici), somministrati alle riceventi 200 mg di progesterone micronizzato (Utrogestan) per via intravaginale e proseguita terapia con 200 mg, tre volte al giorno, fino all'evidenza ecografica di attività cardiaca embrionale. Le destinatarie senza ciclo mestruale hanno seguito lo stesso protocollo, senza GnRH agonisti. Lo sviluppo endometriale valutato mediante ecografia sino al raggiungimento di uno spessore > 8 mm.

Le riceventi hanno seguito lo stesso trattamento delle pazienti appartenenti al gruppo fresco. La loro preparazione è iniziato con GnRH agonisti il 21 ° giorno del ciclo precedente. Confermata l'avvenuta down-regulation, tramite misurazione dei livelli di estradiolo e progesterone, somministrati estrogeni come menzionato precedentemente.

Lo spessore endometriale valutato mediante ecografia transvaginale e l'endometrio considerato recettivo ad uno spessore >9 mm. Con endometrio <9 mm, il ciclo è stato annullato. Nel gruppo degli ovociti vitrificati, con spessore endometriale < 9mm, il riscaldamento degli ovociti non eseguito ed il ciclo rinviato dopo nuova preparazione endometriale.

Pick up ovocitario, fecondazione e valutazione embrioni

Gli ovociti recuperati da ciascuna donatrice sono stati equilibrati nei media di fecondazione (Sage Inc., A Cooper Surgical Company TM; Bedminster, NJ, USA) per 2 ore e poi denudati enzimaticamente (Sage Inc., A Cooper Surgical Company TM). Gli ovociti allo stadio di sviluppo Metafase II (MII) valutati e selezionati mediante stereomicroscopio e quelli con citoplasma scuro, zona granulare centrale, vacuoli o con presenza di un grande globulo polare esclusi dallo studio.

Il giorno della fecondazione, ottenuto un campione di liquido maschile fresco dai rispettivi partner anch'essi precedentemente sottoposti a controlli. L'iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI) performata su tutti i casi.

La fecondazione è stata valutata 16-20h dopo ICSI mediante visualizzazione dei due pronuclei. Gli embrioni coltivati in 30 gocce microlitri di terreno di coltura ricoperto di olio minerale (Fertipro, Bernem, Belgio) in un incubatore da banco MINC™ (Cook Medical) con gas a tripla concentrazione: 6% di CO₂, 5% di O₂ e 89% N₂. La qualità degli embrioni è stata valutata il giorno 3 e il giorno 5.

Al giorno 3 in particolare valutati numero di cellule, comparsa di blastomeri, presenza di difetti citoplasmatici o eventuali frammentazioni (113). Secondo questo schema i migliori embrioni sono stati considerati quelli con 8 -12 blastomeri simmetrici, assenza di difetti citoplasmatici con o senza frammentazione trascurabile. Per la loro valutazione al giorno 5 utilizzati i criteri di Gardner e Schoolcraft (114) in cui la zona pellucida (ZP), la presenza del trofoectoderma liscio, l'uguaglianza e stretta aderenza dei blastomeri, la cavità blastocistica ben visibile e la massa cellulare interna ben sviluppata con le cellule adese tra loro sono stati i parametri più importanti e direttamente correlati la miglior qualità blastocistica. Gli embryo transfert (ET) effettuati il giorno 5 sotto guida ecografica come descritto in precedenza (115) ed i restanti embrioni vitrificati al giorno 5 di sviluppo con sistema chiuso.

Outcomes

I parametri utilizzati per i risultati clinici della nostra ricerca sono stati adottati dal glossario proposto dalla International Committee for Monitoring the Assisted Reproduction Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) del 2009 (116).

- **tasso di gravidanza:** espresso come aumento delle concentrazioni di b-HCG sierica 14 giorni dopo embryo transfert (ET) per 100 ET.
- **tasso di gravidanza clinica:** numero di gravidanze cliniche (comparsa di un sacco gestazionale e visualizzazione di attività cardiaca fetale 7 settimane dopo ET) per 100 cicli di ET.
- **tasso di gravidanza in corso:** numero di gravidanze con visualizzazione di attività cardiaca fetale oltre le 12 settimane di gestazione per 100 ET.
- **tasso di gravidanza biochimica:** gravidanza diagnosticata con la sola rilevazione di beta-HCG nel siero o nelle urine non esitata in una gravidanza clinica per 100 cicli ET.
- **numero di parti:** numero di parti espressi per 100 cicli di ET. (comprende le nascite di uno o più nati vivi e / o nati morti).

Note: La nascita di gravidanza singola, doppia o altra gravidanza multipla registrata come singolo parto.

- **nati vivi:** numero di parti esitati in almeno un nato vivo espressi per 100 cicli di ET
- **tasso di impianto:** numero di sacche gestazionali visualizzate diviso il numero di ET.
- **tasso di aborto spontaneo:** perdita della gravidanza prima della 20ws di età gestazionale per 100 ET

PROTOCOLLI DI VITRIFICAZIONE

Sistema di vitrificazione aperto

Il protocollo di vitrificazione/riscaldamento utilizzato per i nostri studi è stato proposto per la prima volta da Kuwayama (35) e dal 2007 (39) divenuto il protocollo del kit di Kitazato per sistemi aperti. Questo protocollo ha guadagnato enorme popolarità e molti istituti pubblici e privati in tutto il mondo ad oggi lo utilizzano (92). I crioprotettori che vengono utilizzati in questo protocollo sono DMSO e EG (35).

La procedura di vitrificazione aperta ha due fasi. Fase di equilibrio e fase di vitrificazione. Nella prima fase utilizzata una soluzione di equilibratura (ES). La soluzione ES del protocollo a sistema aperto contiene 7,5% di DMSO e 7,5% di EG diluito in un medium Hepes di base (BS). Nella seconda fase, viene utilizzata una soluzione di vitrificazione (VS) contenente 15% di DMSO e 15% di EG diluito in BS.

Durante la fase di equilibratura (figura 3), gli ovociti sono stati inizialmente messi in 20µl di media HEPES base che non contiene crioprotettori. Poi aggiunti 20µl di soluzione di equilibrio (ES) e condotta di attesa per 3 min. Di seguito, aggiunti 20µl di ES ed ulteriore attesa di 3 minuti. Infine 240µl di ES sono stati mescolati con la soluzione precedente ed attesa di 9 min. Pertanto, durata totale della fase ES 15 min (Tabella 1).

Terminata la fase ES, gli ovociti sono stati collocati in una goccia con 300µl di VS per circa 40 secondi. Quindi, entro 20 secondi disposti nella punta di un vettore denominato Cryotop (Figura 4), e lo stesso vettore immerso in azoto liquido. Pertanto, la durata totale della fase di vitrificazione è stata di 1 min. (Tabella 1) Il vettore, a contatto con azoto liquido, è stato inserito in un contenitore protettivo e l'intero dispositivo conservato in serbatoi con LN2.

VITRIFICATION				
Solution type	ES1	ES2	ES3	VS
Time of Exposure	3min	3 min	9 min	1min
WARMING				
Solution Type	TS	DS	WS1	WS2
Time of Exposure	1 min	3min	5min	1min
Time of Exposure	1 min	3min	5min	1min

Tabella 1: Protocollo per vitrificazione e riscaldamento con dispositivi aperti.

Tutte le procedure eseguite a temperatura ambiente tranne la fase TS che viene eseguita a 37 ° C. Il protocollo di riscaldamento post vitrificazione a sistema aperto prevede l'esposizione degli ovociti a tre diverse soluzioni: soluzione di scongelamento (TS) contenente 1M saccarosio diluito in un medium HEPES base, soluzione di diluizione (DS) che contiene 0,5M di saccarosio e soluzione di lavaggio 1 e 2 (WS1 e WS2), che sono medium HEPES base senza saccarosio.

La procedura di riscaldamento inizia con il posizionamento del Cryotop in un contenitore con LN2 (Figura 4.1). Il tappo del dispositivo viene rimosso con una pinza e il vettore direttamente immerso in un piatto contenente 1 ml di TS precedentemente incubato a 37 ° C (Figura 4.2). Gli ovociti presenti nella punta del vettore sono stati mantenuti nella soluzione TS. Dopo 1 minuto in soluzione TS spostati in una goccia con 300µl di soluzione di DS per 3 min. Quindi per 5 min. in WS1 ed infine nel mezzo WS2 per 1 min. (tabella 1). Ultimata la procedura di riscaldamento (Figura 5), gli ovociti sono stati disposti nei media di fecondazione fino all' inseminazione.

Sistema di vitrificazione chiuso

Il protocollo di vitrificazione con sistema chiuso utilizzato è stato una modifica del protocollo descritto da Vanderzwalmen nel 2009 e sfruttato per la vitrificazione asettica di blastocisti (100). Nel trial 1 di seguito, descritto il metodo utilizzato per la vitrificazione con sistema closed.

Allo stesso modo del sistema di vitrificazione aperto, il protocollo contiene DMSO e EG e dispone di 2 fasi: fase di equilibrizzazione e fase di vitrificazione. La differenza tra loro è che il protocollo di vitrificazione chiuso ha una fase di equilibrio con più passaggi (4 invece di 2). Pertanto nella prima fase vi sono quattro soluzioni: raffreddamento 1, 2, 3 e 4, contenenti rispettivamente 1,25%, 2,5%, 5% e il 10% di ogni crioprotettore (figura 5). Nella seconda fase, la soluzione di raffreddamento 5 utilizzata è composta da 20% di ogni crioprotettore.

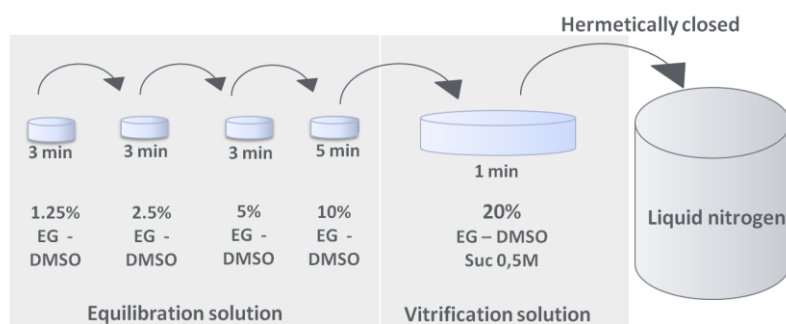
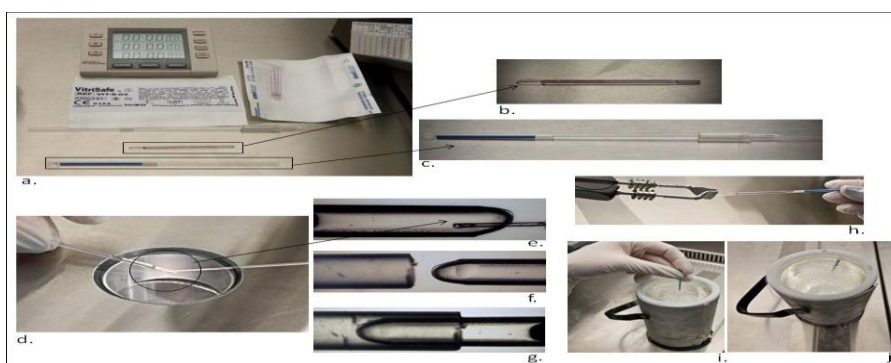


FIGURA 5



**FIGURA 5.1
(VITRISAFE)**

Figure 5 e 5.1: Protocollo di esposizione a CP e dispositivo Vitrisafe.

Il vitrisafe è costituito da due parti: un vettore denominato Vitrisafe (a, b) ed una cannucchia ad alta sicurezza 0.3m (a, c). Il vettore viene inserito nella cannucchia protettiva (d, e, f, g), termosaldato (h) e immerso (I, j) in un contenitore con LN2

VITRIFICATION						
Solution type	Cooling 1	Cooling 2	Cooling 3	Cooling 4	Cooling 5	
Time of Exposure	2-3min	2-3min	2-3min	5-6min	1min	
WARMING						
Solution Type	Warming 1	Warming 2	Warming 3	Warming 4	Warming 5	Warming 6
Time of Exposure	1min	1min	2-4min	2-4min	2-4min	2-4min

Tabella 2: Protocollo di vitrificazione /riscaldamento utilizzando dispositivi chiusi. Tutte le procedure eseguite a temperatura ambiente tranne la fase W1 che viene eseguita in 37 ° C

Gli ovociti MII sono stati disposti per 2-3 minuti in soluzione di raffreddamento 1, 2 e 3 e per 5-6 minuti in soluzione di raffreddamento 4 (tabella 2). Tutte le fasi eseguite utilizzando 100ul di gocce di soluzione di equilibratura coperte da olio.

L'ultimo step include l'esposizione degli ovociti ad una soluzione di vitrificazione di 100 ul volume (goccia prive di olio) per 1 min. (Tabella 2). Ultimato questo step, gli ovociti sono caricati nella punta del vettore Vitrisafe (Vitrimed TM). Questo vettore inserito in una cannuccia ad alta sicurezza e sigillato ermeticamente. L'intero dispositivo immerso in LN2 e conservato in serbatoi criogenici (figura 5).

Per la procedura di riscaldamento è stato utilizzato un protocollo a sei fasi. Questo protocollo è molto simile al protocollo Vanderzwalmen (100) con una lieve modifica (v. parte sperimentale 1).

Le soluzioni di riscaldamento che sono state applicate ad ovociti vitrificati sono state in fase di riscaldamento 1, 2, 3, 4, 5 e 6 e contenevano rispettivamente 1M, 0,75 m, 0.5M, 0.25M, 1.25M e 0M concentrazioni di saccarosio.

Per la procedura, il dispositivo di chiusura è stato immerso in un contenitore con LN2. L'estremità superiore della cannuccia tagliata con una forbice sterile ed allontanata da LN2. Con l'aiuto di un estrattore, rimossa la cannuccia protettiva dal Vitrisafe e disposta in 1 ml di soluzione W1 per 1 min. (Figura 6). A questo punto gli ovociti sono stati esposti a W2 per 1 min., ed a W3, 4, 5 e 6 per 2-4 minuti (tabella 2). L'esposizione degli ovociti in W2 alle soluzioni W6 è stato fatto mediante 100ul di gocce ricoperte di olio. Ultimato il protocollo riscaldamento, gli ovociti disposti nei media di fecondazione fino all'inseminazione.

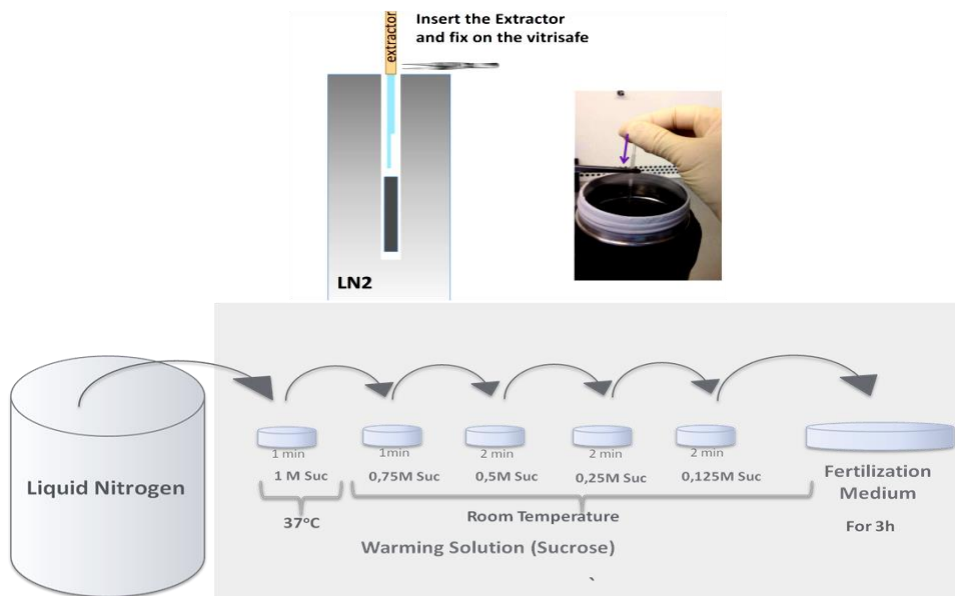


Figura 6: procedura di riscaldamento e reidratazione.

RISULTATI

CLINICAL TRIAL 1

Gli ovociti donati dalla stessa donatrice sono stati randomizzati e casualmente assegnati ai due gruppi: gruppo chiuso (ovociti vitrificati con sistema asettico) gruppo aperto (ovociti vitrificati con modalità open).

In seguito, gli ovociti sono stati riscaldati e donati alle riceventi assegnate in modo casuale per la ricezione di ovociti vitrificati con una delle due tecniche ed aderenti ad un programma di ovodonazione. Lo studio è stato approvato dall'Institutional Review Board (Rif. N. 15/2013 del 09/12/2013) ed il consenso informato ottenuto da tutte le donne.

Analisi e dimensione del campione

Dati precedenti (non pubblicati) dell'IVF Iakentro Center hanno dimostrato che il 64% degli embrioni di buona qualità al giorno 3 di sviluppo (6-8 cellule di dimensioni con massimo 10% di frammentazione del volume totale dell'embrione) (113) sono stati ottenuti da ovociti freschi inseminati (ovodonazione) ed il 44% di embrioni di buona qualità provenienti da ovociti donati e vitrificati con metodica open. Di conseguenza, una diminuzione di oltre il 20% in qualità embrionaria post vitrificazione sia con metodica aperta o chiusa sarebbe comprensibilmente inaccettabile.

Il calcolo di analisi della potenza statistica ha mostrato come siano necessari 94 cicli per ciascun gruppo di studio per ottenere una significatività del 5% con un 80% di potenza statistica.

I dati espressi come media \pm SD. Test chi-quadro ed independent sample t-test utilizzati per confrontare risultati biologici e clinici di ovociti fecondati ed inizialmente vitrificati con uno dei due sistemi. Valori di $P < 0,05$ considerati statisticamente significativi. L'analisi è

stata effettuata utilizzando il Statistical Package for Social Sciences Version 17.0 (IBM/SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Novantasette (n = 97) donatrici di ovociti sono state selezionate presso il centro di IVF Iakentro dal gennaio 2014 al settembre 2016.

Un unico tentativo è stato incluso per ogni donatrice. Nel caso di risposta ovarica inferiore alle aspettative e con meno di dieci ovociti recuperati al pick up, le stesse donatrici (n = 2) sono state escluse dall'analisi statistica. Il numero finale delle donatrici incluse è risultato essere 95.

Un totale di 190 riceventi abbinati con le rispettive donatrici sono state incluse nello studio. Le pazienti destinatarie hanno ricevuto un embryo transfert di prova nel ciclo precedente alla fecondazione in vitro, e se riscontrata difficoltà all'accesso effettuata una dilatazione cervicale propedeutica (110).

Le riceventi ovociti sono state randomizzate in due gruppi che hanno ricevuto sia ovociti vitrificati con sistema chiuso (n = 95) sia con sistema aperto (n = 95), Il tutto con il contributo di uno statistico informatico (figura 7). Tutte le pazienti sono state coinvolte nello studio una volta sola.

Gli ovociti recuperati da ciascuna donatrice sono stati equilibrati per 2 ore e poi denudati enzimaticamente (Sage Inc., A Cooper Surgical CompanyTM). Ovociti in metafase II (MII) valutati e selezionati allo stereomicroscopio. Quelli con citoplasma scuro, zona granulare centrale, vacuoli o un grande globulo polare esclusi dalla procedura di vitrificazione.

Gli ovociti selezionati sono stati randomizzati e casualmente assegnati ad uno dei gruppi di vitrificazione. Un'ora più tardi, quelli in metafase II (MII) vitrificati con sistema chiuso o aperto.

Gli ovociti vitrificati sono stati riscaldati, fecondati e trasferiti alle pazienti destinatarie ed in corso di trattamento con terapia ormonale sostitutiva (HRT) come precedentemente descritto (118). Nel momento in cui l'endometrio della ricevente è stato adeguatamente preparato (> 9mm) per ricevere l'ET, iniziata la somministrazione di progesterone e lo stesso giorno gli ovociti selezionati dalla randomizzazione nei due sistemi chiuso e aperto sono stati riscaldati e fecondati (figura 7).

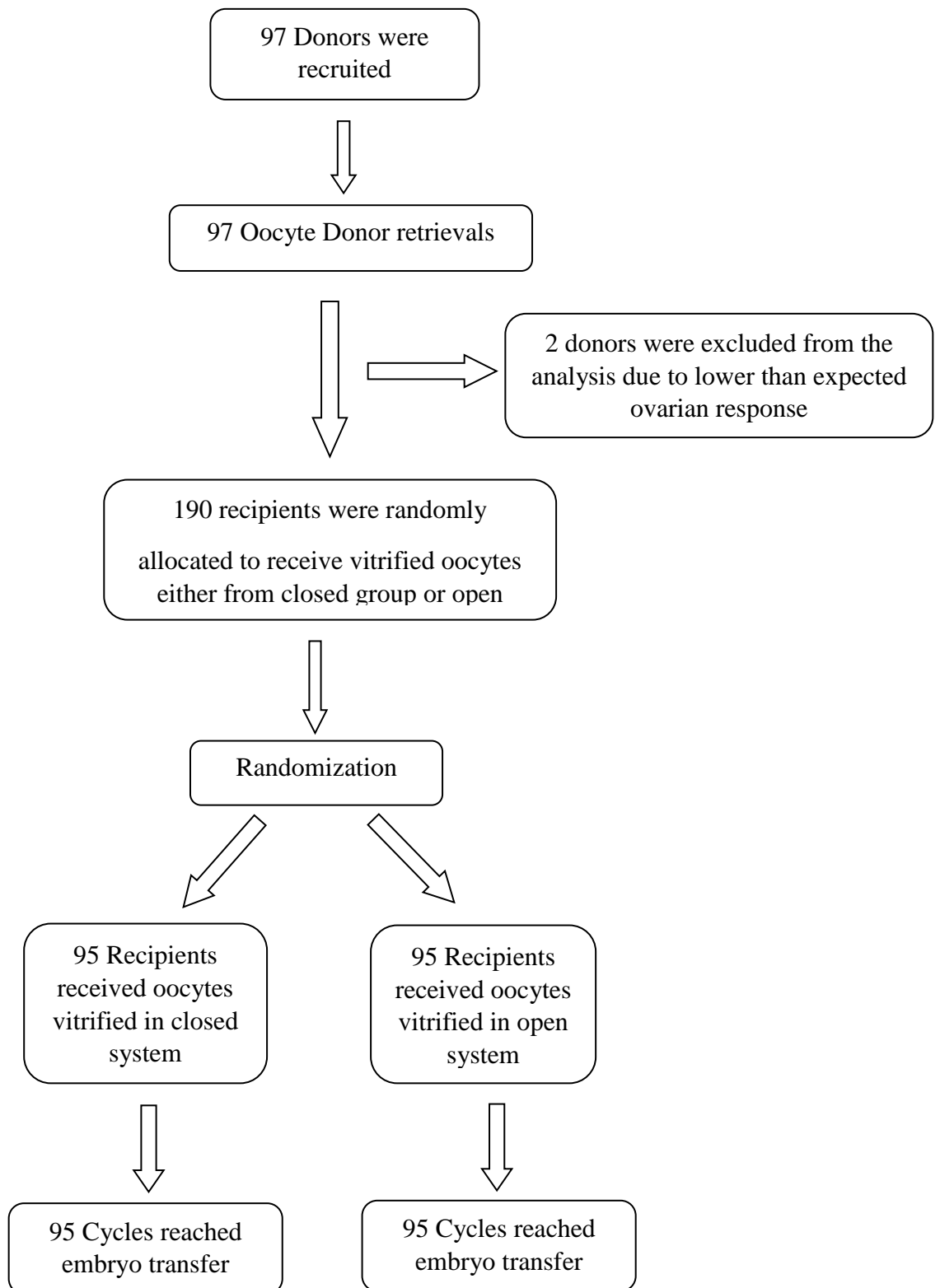


Figura 7: Diagramma di flusso di inclusione e randomizzazione pazienti trattati nel trial 1.

Procedure di vitrificazione e riscaldamento

Gli ovociti sono stati vitrificati utilizzando il dispositivo Vitrisafe (figura 5) in entrambi i protocolli (aperti e chiusi). Questo dispositivo è costituito da due parti: un vettore chiamato Vitrisafe (VitriMed, Austria) ed una cannuccia ad alta sicurezza di 0,3 ml (Cryo Bio System, Francia).

Per la procedura di vitrificazione il vettore deve essere inserito nella cannuccia ad alta sicurezza con azione protettiva. La base per le soluzioni di vitrificazione (equilibratura e vitrificazione) e la procedura di riscaldamento degli ovociti è stato il Quinns Advantage Medium con Hepes (Sage Inc., A Cooper Surgical Company TM) più un'integrazione con 20% di siero proteico (SPSS) (Sage Inc., A Cooper Surgical Company TM). Tutte le soluzioni prodotte nel laboratorio IVF Iakentro.

Open system

Nel protocollo aperto, la vitrificazione degli ovociti eseguita secondo il protocollo Kitazato (39) ma utilizzando il dispositivo vitrisafe. L'equilibratura effettuata gradualmente in 7,5% di glicole etilenico (EG) e 7,5% dimetilsolfossido (DMSO) a temperatura ambiente per 15 minuti. Successivamente, gli ovociti sono stati trasferiti in una soluzione con 15% EG, 15% DMSO e 0,5 M di saccarosio per 1 min., e poi immessi sul vitrisafe in singola goccia. La soluzione in eccesso è stata rimossa per lasciare solo uno strato sottile attorno ad ogni ovocita e il vettore immerso direttamente in azoto liquido. Il vitriplug costituitosi inserito nella cannuccia protettiva già posta in contatto con LN2. Questa manovra è stata eseguita all'interno del LN2 mediante una pinza. Una volta che il vettore è stato nella cannuccia protettiva, il bordo aperto della cannuccia protettiva è stato tirato fuori dell'azoto liquido; termosaldato (Thermo Scientific) ed infine immersi in azoto.

Per la procedura di riscaldamento, l'estremità della cannuccia protettiva è stata tagliata; il vettore rimosso dal LN2 e rapidamente immerso in 1 ml di soluzione di riscaldamento 37 ° C contenente 1,0 M di saccarosio per 1 min. Poi, gli ovociti sono stati trasferiti in una

soluzione a temperatura ambiente contenente 0,5M saccarosio, ed incubati per 3 min. Dopo due successive procedure di lavaggio in ambiente basico a temperatura ambiente per 6 minuti in totale, gli ovociti trasferiti in un medium di fecondazione (Sage Inc.).

Esposizione a soluzioni di CP con utilizzo di sistema chiuso

Vitrisafe è un dispositivo di vitrificazione chiuso che consente una velocità di raffreddamento di $<2.000^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ (100). Per evitare il rischio di formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari (34) abbiamo dovuto usare concentrazioni superiori di crioprotettori. Il protocollo utilizzato per il sistema chiuso è stato una modifica del protocollo precedentemente citato ed utilizzato per la vitrificazione di blastocisti (100.119). Nel paragrafo precedente abbiamo dimostrato nel dettaglio come abbiamo costituito il nuovo protocollo adottato per la vitrificazione con metodica asettica.

Per quanto riguarda il procedimento, la soluzione di equilibratura (ES) consisteva di 10% DMSO (v / v) (Sigma-Aldrich) e 10% di glicole etilenico (EG) (v / v) (Fluka) mentre la soluzione di vitrificazione (VS) 20% DMSO (v / v) (Sigma-Aldrich), 20% di glicole etilenico (EG) (v / v) (Sigma) e 0.75mol / L di saccarosio (Sigma-Aldrich). Inoltre, sono state preparate tre diluizioni (1/8, 1/4, 1/2) delle ES.

Analogamente, quattro soluzioni di riscaldamento (WS) sono state preparate contenenti rispettivamente 1, 0,75, 0,5 e 0,25 mol / L di saccarosio(Sigma-Aldrich). Un'ora dopo la loro denudazione, 3 ovociti per volta, sono stati trasferiti attraverso le quattro soluzioni di equilibratura mediante 50 μl gocce ricoperte di olio. Questa fase è durata 14 min., cioè 2min a 1/8 diluizione ES, 2min. a 1/4 ES, 4 min. a 1/2 ES e 6 min. in ES.

Successivamente, gli ovociti trasferiti per 1 minuto in una goccia di soluzione di vitrificazione di 100ul e priva di olio. Gli ovociti, mediante una singola goccia, sono stati inizialmente trasferiti sul Vitrisafe. La soluzione in eccesso è stata rimossa per lasciare solo uno strato sottile attorno ad ogni ovocita ed il vettore inserito nella cannucchia protettiva, termo-saldato ed immerso in un contenitore con LN2. Per la procedura di riscaldamento, la cannucchia protettiva del Vitrisafe è stata tagliata e la parte esposta della cannucchia immediatamente rimossa da LN2 e disposta in una soluzione di riscaldamento contenente 1,0 M saccarosio a 37° C per 1 min.

Quindi, gli ovociti sono stati posti in una soluzione di riscaldamento con 0.75 M di

saccarosio a temperatura ambiente per 1 min. e 4 min. in 0.5M ed infine altri 4 minuti in 0.25M di soluzione di riscaldamento con saccarosio. Infine, disposti in un medium di fecondazione (Sage Inc.) ed incubati per 2 ore a 37 ° C.

Gli ovociti degenerati rimossi dalla coorte.

Gli ovociti sopravvissuti coltivati a 37 °C (6% di CO₂ e 5% di O₂) per 2 ore. L'iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI) eseguita su tutti gli ovociti sopravvissuti entro 2 ore dopo il riscaldamento. Per i terreni di coltura degli embrioni utilizzati i SAGE sequential media. Al giorno 3 di sviluppo gli embrioni valutati qualitativamente ed ET eseguito lo stesso giorno 3 di sviluppo.

Analisi statistica

Effettuato follow-up clinico di tutti i casi finalizzato alla raccolta dati. chi-quadro test ed indipendente t-test utilizzati per confrontare i risultati biologici e clinici ottenuti da ovociti fecondati ed inizialmente vitrificati con uno dei due sistemi. Valori di $P < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi è stata effettuata utilizzando lo Statistical Package for Social Sciences Version 17.0 (IBM/SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Risultati

97 donatrici sono state incluse nello studio ed a causa della minor risposta ovarica attesa (≤ 10 ovociti recuperati), 2 cicli di ovodonazione e le loro rispettive 6 riceventi abbinate esclusi dall'analisi statistica (Figura 7).

Tutte le destinatarie erano nullipare. L'età media (44.79 ± 1.38 vs 44.81 ± 1.52 anni) e lo spessore endometriale medio ($10,17 \pm 1,12$ vs $10,43 \pm 1,31$ millimetri) dei destinatari non sono risultati differenti tra i due gruppi (tabella 4).

Un totale di 1544 ovociti MII sono stati recuperati. Il sistema (asettico) di vitrificazione chiuso è stato utilizzato per 754 di loro mentre 790 vitrificati con sistema aperto (Tabella4). Non riscontrata alcuna differenza nel numero medio di ovociti vitrificati tra le due tecniche ($7,94 \pm 2,39$ vs $8,31 \pm 2,57$). Anche se il tasso di sopravvivenza è risultato significativamente più basso nel gruppo chiuso rispetto al gruppo aperto ($81,2\%$ vs $91,1\%$ $p < 0.05$), il tasso di fecondazione ($83,1\%$ vs $73,1\%$), il tasso di scissione ($93,1\%$ vs $93,5\%$) e la percentuale di embrioni di migliore qualità al giorno 3 di sviluppo ($36,7\%$ vs $39,4\%$) non significativamente differenti tra i due gruppi (Tabella 4).

Novanta cinque trasferimenti sono stati eseguiti in ciascun gruppo.

Il numero medio di embrioni trasferiti è stato simile in entrambi i gruppi ($2,70 \pm 0,45$ vs $2,79 \pm 0,53$). Inoltre, nessuna differenza statisticamente significativa nel tasso di b-HCG positivo ($42,1\%$ vs $32,6\%$), nel tasso di gravidanza clinica ($35,8\%$ vs $27,4\%$), tasso di impianto ($15,6\%$ vs $12,4\%$), tasso di gravidanza in corso ($33,7\%$ vs $25,2\%$) e tasso di nati vivi ($33,7\%$ vs $25,2\%$) tra i due gruppi (tabella 5).

	Closed System n=95	Open System n=95
Age of recipient (years)	44.79±1.38	44.81±1.52
Endometrial Thickness (mm)	10.17±1.12	10.43±1.31
Vitrified Oocytes	754 (7.94 ± 2.39)	790 (8.31±2.57)
Survived Oocytes (Survival rate)	612 (6.44 ± 1.67) (81.2%)	720 (7.58±2.42) (91.1%)
Fertilized Oocytes (Fertilization rate)	509 (5.36 ± 1.84) (83.1%)	526 (5.53 ± 1.84) (73.1%)
Cleaved Embryos (Day 3) (Cleavage rate)	474 (4.99 ± 1.68) (93.1%)	492 (5.18 ± 1.71) (93.5%)
Top quality (grade 1, Veeck 1999) embryos on Day 3	174 (1.83 ± 1.12) (36.7%)	194 (2.04 ± 1.08) (39.4%)
Embryonic Score (according to Veeck, 1999)	2.61 ± 1.24	2.59 ± 1.28

Tabella 4. Età ricevente, spessore endometriale, parametri embriologici. Valori espressi come media ± SD. Tasso di sopravvivenza significativamente più basso nel gruppo chiuso. P <0.05.

	Closed System n=95	Open System n=95
N embryos transferred	257 (2.70±0.45)	266 (2.79±0.53)
Positive b-HCG /cycle	40/95 (42.1%)	33/95(34.7%)
Clinical Pregnancy rate/cycle	34/95 (35.8%)	26/95 (27.4%)
Implantation rate	40/257 (15.6%)	31/266 (12.4%)
Ongoing pregnancy rate/cycle	32/95 (33.7%)	24/95 (25.2%)
Live birth rate/cycle	32/95 (33.7%)	24/95 (25.2%)

Tabella 5. Parametri clinici. Non differenze statisticamente significative tra i due gruppi.

CLINICAL TRIAL 2

Al fine di valutare l'efficienza dei dispositivi ermeticamente chiusi nelle procedure di vitrificazione ovocitaria abbiamo confrontato outcomes clinici post transfert di embrioni derivati da ovociti fratelli a riceventi ovociti freschi o vitrificati (closed) e randomizzati in due gruppi nel nostro programma di ovodonazione. Abbiamo condotto un secondo studio prospettico, osservazionale, di coorte presso IAKENTRO IVF - Fertility Center dal gennaio 2014 fino al settembre 2016. La data di inizio di reclutamento è stata il 19/1/2014 e la data di completamento il 15/09/2016. Tutte le procedure sono state eseguite nello stesso laboratorio. Questo studio è stato registrato nel registro ISRCTN con numero di identificazione ISRCTN56275481. Inoltre, lo studio è stato approvato dal IAKENTRO Review Board (Rif. N. 15/2013, 12/09/2013) e il consenso informato ottenuto da tutte le pazienti.

Dimensione del campione e disegno dello studio

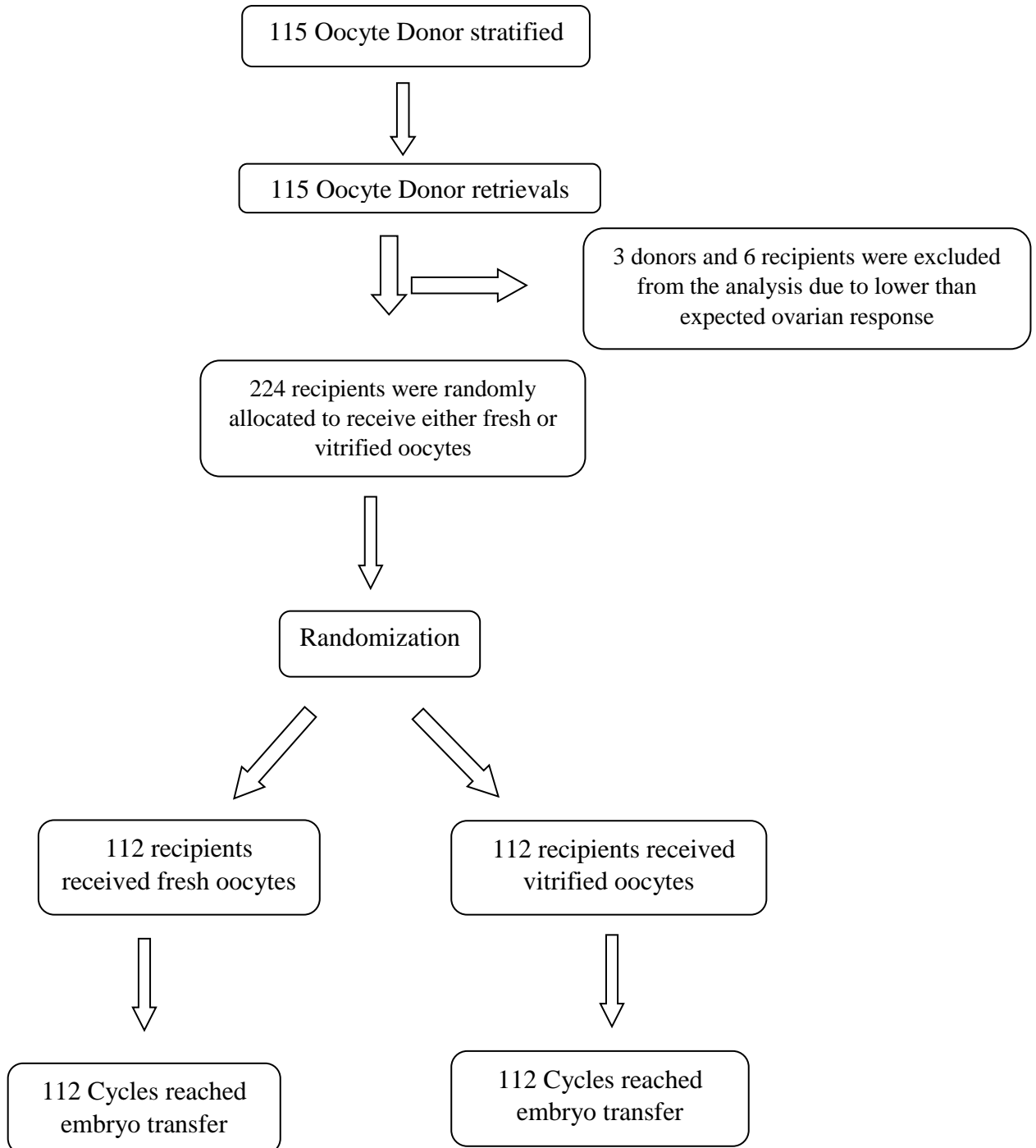
Cento quindici donatrici di ovociti sono state arruolate per questo studio. Un singolo ciclo di stimolazione singolo incluso per ogni donatrice. Le coppie destinatarie incluse nello studio in peculiare condivisione di ovociti provenienti da stessa donatrice.

Ogni coppia costituita da una ricevente ovociti freschi e da un'altra ricevente ovociti vitrificati (utilizzati dopo un breve periodo di tempo).

Un singolo ciclo di donazione è stato incluso per ogni ricevente. Duecento trenta coppie hanno ricevuto ovociti donati dalla stessa donatrice ed assegnati a ricevere rispettivamente 115 ovociti freschi ed altrettante ovociti fratelli vitrificati (115 casi) mediante randomizzazione. Valutati parametri biologici e clinici.

Il calcolo della potenza statistica effettuato mediante Sealed Envelope Ltd. 2012. (39)

Figura 8: Diagramma di flusso di inclusione e randomizzazione pazienti trattati nel trial 2.



Procedure di laboratorio

Gli ovociti recuperati da ciascuna donatrice sono stati equilibrati in Single Step Medium™ (SSM™, Irvine Scientific) per 2 ore e poi denudati enzimaticamente (Hyaluronidase Solution, Irvine Scientific). Solo ovociti MII sono stati inclusi nei gruppi di studio. Gli ovociti appartenenti al gruppo fresco (gruppo 1) sono stati iniettati un'ora dopo e post denudazione. Gli ovociti vitrificati appartenenti al gruppo chiuso (gruppo 2) iniettati dopo un arco temporale da 30 min. ad un'ora post denudazione. Dopo il loro riscaldamento, gli ovociti sono stati coltivati in Single Step Medium™ (SSM™, Irvine Scientific) per 3 ore prima di essere iniettati. Iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi (ICSI) effettuata in tutti i casi.

La fecondazione avvenuta 16-20h dopo ICSI tramite visualizzazione dei due pronuclei. Gli embrioni sono stati coltivati in 30 gocce microlitri di Single Step Medium™ (SSM™, Irvine Scientific), ricoperte di olio minerale (Fertipro, Bernem, Belgio) in un incubatore da banco MINC™ (Cook Medical) con gas a tripla disponibilità: 6% di CO₂, 5% di O₂ e 89% N₂.

La qualità embrionaria valutata al giorno 3 e al giorno 5 di sviluppo. Al giorno 3 in particolare valutati embrioni, numero di cellule, comparsa di blastomeri ed eventuale presenza di difetti citoplasmatici o frammentazioni (113). Secondo questo sistema, la miglior divisione embrionaria considerata quella con visualizzazione di 8 -12 blastomeri simmetrici con assenza di difetti citoplasmatici e senza o con frammentazione trascurabile. Per la valutazione del giorno 5 di sviluppo abbiamo utilizzato i criteri di Gardner e Schoolcraft (114) in cui la zona pellucida sottile, il trofoectoderma liscio, l'uguaglianza e la stretta aggregazione tra i blastomeri, così come la cavità blastocistica ben visibile e la massa cellulare interna ben sviluppata con la presenza delle cellule ben adese fra loro sono i parametri più importanti correlati con la migliore qualità blastocistica.

ET effettuati al giorno 5, sotto guida ecografica come descritto in precedenza (115) ed i restanti embrioni vitrificati al giorno 5 con metodica closed aseptica.

Vitrificazione ovocitaria con sistema chiuso

Gli ovociti sono stati vitrificati utilizzando il vettore Vitrisafe (100) (VitriMed, Austria), dopo un massimo di 3 ore dal pick up. Gli ovociti denudati sono stati esposti a 4 soluzioni di equilibratura con 1,25%, 2,5%, 5% e il 10% di concentrazione di DMSO ed etinil glicole (Fertipro™) per 3, 3, 3 e 5.30 minuti rispettivamente ed ad una soluzione di vitrificazione con il 20% di DMSO e 20% di glicole etilenico più 0,75 mol / l di saccarosio e 10 mg / l Ficoll (Fertipro™) per 1 min. Dopo l'esposizione ai crioprotettori gli ovociti, mediante una singola goccia, trasferiti in Vitrisafe ed il vettore inserito nella cannucchia protettiva termosaldada ed immersa in un contenitore con LN2.

Tutte le procedure sono state eseguite a temperatura ambiente (~ 25 ° C).

Il riscaldamento è stato eseguito in 5 fasi come descritto in precedenza (120). Quindi gli ovociti sono stati esposti a concentrazioni con riduzioni gradualmente (1M, 0,75 m, 0.5M, 0,25M, 0,125M) e di saccarosio per 1, 1, 2, 2, 2 min., rispettivamente (Fertipro™).

La reidratazione degli ovociti è stata eseguita a temperatura ambiente (~ 25 ° C), con l'eccezione della prima fase, in cui il vitrisafe è stato immerso in una soluzione calda (37 ° C) di 1M di saccarosio per 1 min. Quindi posizionati nel terreno di coltura (SSM™, Irvine Scientific) ed incubati per 3 ore a 37 ° C (6% CO₂ e 5% O₂) prima di essere iniettati. Gli ovociti degenerati sono stati rimossi dalla coorte.

Outcomes

Analizzati il numero di ovociti sopravvissuti e fecondati, la divisione embrionaria, la qualità di scissione, le blastocisti e le blastocisti di alta qualità oltre agli embrioni trasferiti. Il tasso di sopravvivenza degli ovociti è stato definito come il numero di ovociti sopravvissuti rispetto al numero totale di ovociti riscaldati. L'ICSI è stata performata su tutti gli ovociti sopravvissuti.

Il tasso di fecondazione definito come il numero di ovociti fecondati rispetto al numero di ovociti sopravvissuti.

Scissione embrionaria, migliore scissione, blastocisti e percentuali di blastocisti di migliore qualità definiti rispettivamente come il tasso di divisione embrionaria, di migliore scissione, di blastocisti e di blastocisti di alta qualità rispetto al numero totale di (MII) ovociti maturi.

Outcomes primari e secondari.

L'endpoint primario dello studio è stato il tasso di beta-hCG positivo per ciclo.

Endpoint secondari il tasso di gravidanza clinica per ciclo, il tasso di gravidanza in corso, il tasso di gravidanza biochimica, il tasso di aborto spontaneo, il tasso di gemellarità ed il tasso di nati vivi. Così come il tasso di sopravvivenza ovocitaria, il tasso di fecondazione, di divisione embrionaria, di miglior velocità di scissione, percentuali di blastocisti e di miglior qualità.

Analisi statistica

I dati continui espressi come media \pm SD, mentre i dati categorici in percentuale (%). La normalità è stata valutata con test di Kolmogorov-Smirnov. Independent sample t-test utilizzato per le variabili parametriche ed il Mann-Whitney per le variabili numeriche non parametriche. I dati categorici analizzati con il chi-quadro test. L'analisi statistica effettuata utilizzando il pacchetto Statistical Package for Social Sciences Version 17.0 (IBM / SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Il test di non-inferiorità effettuato utilizzando il potere calcolatore del sealed envelope™ (www.sealedenvelope.com).

RISULTATI

I dati provenienti da 224 destinatari sono stati raccolti prospetticamente da gennaio 2014 a settembre 2016. Nessun caso eliminato a causa di mancata fecondazione, fallimento o sopravvivenza delle blastocisti. Le caratteristiche delle donatrici, delle riceventi e dei partner maschili sono risultati simili tra i due gruppi (Tabella 6).

Un totale di 2820 ovociti sono stati recuperati, 1430 nel gruppo 1 e 1390 nel gruppo 2. 2394 di questi ovociti erano allo stadio MII e di questi 1196 appartenenti al gruppo fresco e 1198 al gruppo chiuso (Tabella 7).

Nessuna differenza nel numero degli ovociti assegnati tra i due gruppi (10.6 ± 2.1 vs 10.7 ± 2.0 , $p = 0,94$), confermando l'ipotesi iniziale che il nostro metodo di assegnazione degli ovociti non determini una non equa distribuzione di ovociti MII tra i due gruppi.

Il tasso di sopravvivenza degli ovociti del gruppo 2 è stato del 92,5% (1108/1198 ovociti). Non osservata alcuna significativa differenza per quanto riguarda le percentuali di fecondazione, scissione, embrioni di alta qualità al giorno 3 e percentuali di blastocisti tra i due gruppi. Le percentuali di blastocisti di migliore qualità al giorno 5 sono risultate significativamente più alte nel gruppo con ovociti freschi (31,5% vs 26,1%, $p = 0,004$). I parametri embriologici sono elencati in tabella 7.

Centododici ET sono stati eseguiti in ciascun gruppo. Il numero medio di embrioni trasferiti è risultato simile tra i due gruppi ($2,0 \pm 0,0$ vs $1,95 \pm 0,5$, $P = .28$). Nessuna significativa differenza tra i due gruppi per quanto riguarda i tassi di gravidanza (b-hCG positivo) per ciclo (63,3% vs 62,5%, $p = 0,89$) e tassi di gravidanza clinica per ciclo (56,3% vs 57,1%, $p = 0,89$). Non abbiamo osservato differenze rispetto a tutti gli altri parametri valutati tra i due gruppi. Per quanto riguarda i nati vivi, 80 bambini sani sono nati dal gruppo fresco e 75 del gruppo con vitrificazione asettica. Gli outcome clinici primari e secondari del presente studio clinico sono elencati nella Tabella 8.

Donor characteristics			
Age	28.1 ± 3.3		
BMI	22.7 ± 2.4		
Days of stimulation (range)	9.6 ± 1.2 (8-12)		
Total r FSH (IU)	2188 ± 396		
E2 (pg/ml)	2220 ± 620		
Recipient characteristics			
	Group 1 (fresh oocytes) n=112	Group 2 (vitrified oocytes) n=112	p values
Age	43.0 ± 3.6	43.3 ± 3.7	.59
Endometrium thickness	10.8 ± 1.0	10.7 ± 0.9	.46
BMI	23.9 ± 3.6	23.7 ± 3.2	.64
Days of endometrial preparation	16.9 ± 1.1	16.8 ± 0.5	.42
Male partner characteristics			
	Group 1 (fresh oocytes) n=112	Group 2 (vitrified oocytes) n=112	p values
Age	43.8 ± 5.4	42.8 ± 5.5	.37
Sperm concentration (millions/per ml)	49.1 ± 22.7	46.5 ± 22.2	.41
Motility	68.1 ± 11.5	67.9 ± 11.3	.87
Forward motility	55.1 ± 14.1	55.6 ± 13.9	.71
Morphology	16.6 ± 4.2	16.5 ± 4.4	.89

Tabella 6: Caratteristiche delle donatrici, delle riceventi e loro partner maschili

Tabella 7: Outcomes biologici dei due gruppi di studio

	Group 1 (fresh oocytes) n=112	Group 2 (vitrified oocytes) n=112	P
Retrieved oocytes	12.8 ± 2.2 (1430)	12.4 ± 2.3 (1390)	.84
MII oocytes	10.6 ± 2.1 (1196)	10.7 ± 2.0 (1198)	.94
Vitrified Oocytes	-	10.7 ± 2.0 (1198)	-
Survived Oocytes	-	9.7 ± 2.1 (1108)	-
Survival rate, %	-	92.5% (1108/1198)	-
Fertilized Oocytes	8.7 ± 1.6 (971)	8.0 ± 1.5 (902)	.21
Fertilization rate, %	81.2% (971/1196)	81.4% (902/1108)	.89
Cleaved Embryos (Day 3)	8.0 ± 1.4 (897)	7.5 ± 2.1 (841)	.31
Cleavage rate, %	75.0% (897/1196)	75.9% (841/1108)	.62
Top quality cleaved embryos	4.4 ± 1.8 (494)	4.2 ± 2.0 (466)	.52
Top quality cleavage rate, %	41.3% (494/1196)	42.1% (466/1108)	.71
Blastocysts	5.3 ± 1.6 (591)	4.9 ± 2.2 (536)	.11
Blastocyst rate, %	49.4% (591/1196)	48.2% (536/1108)	.61
Top quality Blastocyst	3.3 ± 2.2 (377)	2.6 ± 1.6 (289)	.003
Top quality blastocyst rate, %	31.5% (377/1196)	26.1% (289/1108)	.004
Embryos transferred	2.0 ± 0.0 (224)	1.95 ± 0.5 (218)	.28
Vitrified embryos	2.7 ± 1.7 (381)	2.6 ± 1.6 (336)	.18

	Group 1 (fresh oocytes) <i>n=112</i>	Group 2 (vitrified oocytes) <i>n=112</i>	P value
Positive b-hCG	63.3% (71/112)	62.5% (70/112)	.89
Clinical Pregnancy rate	56.3% (63/112)	57.1% (64/112)	.89
Ongoing pregnancy rate	51.8% (58/112)	53.6% (60/112)	.79
Implantation Rate	42.9% (96/224)	39.4% (86/218)	.47
Biochemical pregnancy rate	7.1% (8/112)	2.7% (3/112)	.12
Miscarriage rate	4.5% (5/112)	6.3% (7/112)	.55
Delivery rate	50.8% (57/112)	51.8% (58/112)	.89
Twin Pregnancy rate	40.4%(23/57)	29.3%(17/58)	.21
Live births	80	75	-

Tabella 8: Outcomes clinici dei due gruppi di studio

DISCUSSIONE

La presente tesi ha come scopo principale quello di validare e confermare l'applicazione della tecnica di vitrificazione come tecnica di crioconservazione per ovociti umani e per la preservazione della fertilità femminile.

La vitrificazione può essere eseguita con successo sia con dispositivi aperti che chiusi e la nostra ricerca ne è una valida dimostrazione.

I risultati ottenuti ci spingono a confermare la metodica closed - aseptica come valida e perseguibile alternativa rispetto alla più adoperata tecnica open sia in termini di risultati biologici che clinici senza alcuna preoccupazione per quanto concerne la sicurezza biologica del tessuto umano spesso oggetto di discussione in merito al suo diretto contatto con l'azoto liquido.

Il primo obiettivo della nostra ricerca è stato quello di applicare il sistema di vitrificazione chiuso e di confrontarlo con la tecnica open system ed il clinical trial 1 è stato progettato proprio per questo fine.

Il nostro studio randomizzato e prospettico ha mostrato come in cicli di ovodonazione, anche se il tasso di sopravvivenza ovocitario mostrasse valori più bassi nel gruppo chiuso, allo stesso modo il tasso di fecondazione, sviluppo embrionale, percentuali di b-HCG positive, tassi d'impianto, gravidanza clinica e tassi di nati vivi non differivano tra i due gruppi.

In tale processo, al fine di eliminare eventuali fattori confondenti legati alla stimolazione ovarica abbiamo analizzato una popolazione di ovodonatrici e le rispettive destinatarie condividenti ovociti da medesima donatrice. Inoltre, le destinatarie hanno ricevuto ovociti in modo casuale, riducendo ulteriormente eventuali distorsioni statistiche.

Questo confronto diretto tra le due tecniche di vitrificazione chiusa e aperta ha mostrato un tasso di sopravvivenza significativamente più basso nel chiuso (81,2%) rispetto al gruppo aperto (91,1%). Risultati simili sono riportati in letteratura in uno studio che mette a confronto le due tecniche di vitrificazione closed (tasso di sopravvivenza 57,9%) vs open (tasso di sopravvivenza 82,8%) (121).

Una possibile spiegazione di questa differenza potrebbe essere nei tassi di raffreddamento più bassi che si sviluppano nei dispositivi chiusi (<2.000°C / min.) rispetto a quelli presenti

nei dispositivi aperti ($> 20.000^{\circ}\text{C} / \text{min}$) (100). Tuttavia, in letteratura sono stati recentemente riportati tassi di sopravvivenza in favore del sistema chiuso (122). Inoltre, i tassi di sopravvivenza in sperimentazione clinica 1 sono paragonabili ai tassi riportati in studi multicentrici di coorte (123) e studi di controllo randomizzati utilizzando sistemi di vitrificazione aperti o con congelamento lento (124).

Un altro parametro che potrebbero influenzare la sopravvivenza degli ovociti è il tasso di riscaldamento altrettanto essenziale al pari della velocità di raffreddamento che secondo gli studi di Mazur e Seki (Mazur et al 2012, Seki 2012) sono da considerarsi più importanti dei secondi. Il dispositivo Vitrisafe garantisce tassi di riscaldamento simili ai dispositivi di vitrificazione aperti (ad es Cryotop), poichè la punta del vettore è immersa direttamente nel medium di riscaldamento fornendo alti tassi dello stesso.

Il protocollo utilizzato nel sistema chiuso di questo studio è stato basato su un'analisi cinematografica (Vanderzwalmen 2010) che mostra in modo tangibile le fasi di collasso e gonfiore ovocitario in risposta allo stress osmotico. Un protocollo simile è stato proposto (125) con procedura di vitrificazione in sette passaggi e con una maggiore concentrazione di CP per ogni passaggio.

Tuttavia la procedura gold standard determinante gli effettivi e necessari steps deve essere ulteriormente performata. In termini di parametri biologici e clinici abbiamo visto che più passaggi di soluzioni di equilibrizzazione hanno dato risultati simili alla metodica open. Al contrario, un recente studio (122) mostrerebbe come la vitrificazione chiusa possa essere ottenuta senza la necessità di modificare l'esposizione al crioprotettore necessario a contrastare le ridotte velocità di raffreddamento.

È stato riportato in letteratura che il sistema aperto darebbe maggiori risultati del sistema chiuso (121). In questo studio il tasso di sopravvivenza, il tasso di fecondazione, di scissione embrionaria ed il tasso di gravidanza clinica sono risultati significativamente più bassi nel sistema chiuso rispetto all'aperto.

I risultati ottenuti dal nostro trials 1 sono stati differenti e sussistono diverse possibili spiegazioni a riguardo. Se consideriamo ad es. lo studio della Pafoni et al. (2011), non è stato uno studio randomizzato controllato in un programma di ovodonazione ed i dispositivi utilizzati per la procedura di vitrificazione erano diversi. Essi utilizzarono (2011) il Cryotip per il protocollo chiuso e il Cryotop per il protocollo aperto. Nel nostro studio il dispositivo vitrisafe è stato usato per tutti i casi. Nei sistemi con vitrificazione aperti gli ovociti sono in contatto diretto con LN2 e per di più i dispositivi utilizzati possono essere facilmente confrontati.

Nelle procedure con sistemi chiusi, quando si utilizzano dispositivi diversi questi possono avere diverse capacità termoisolanti a causa del diverso design, diverse cannuccie protettive e spessore del vettore oltre che per i diversi materiali utilizzati per la loro produzione. Ma la differenza principale tra i due sistemi chiusi è che cryotip utilizza bassi tassi di riscaldamento, mentre Vitrisafe tassi molto più elevati.

Questa potrebbe essere una differenza dannosa tra i due dispositivi e giustificare le differenze riscontrate tra le due prove. Un altro studio che utilizza dispositivi con sistemi chiusi simili è stato pubblicato recentemente (122) e mostra buone percentuali di sopravvivenza (90,2%), fecondazione (77,5%) e sviluppo embrionario (61,6%).

Il tasso di impianto tra i due gruppi (chiuso: 13,9%, aperto: 10,2%) del nostro studio non ha mostrato alcuna differenza. Ma quando mettiamo a confronto questi valori con i tassi di impianto del nostro programma di ovodonazione di ovociti freschi notiamo come questi sono significativamente più bassi. Ciò può essere spiegato dal fatto che una parte significativa degli ovociti vitrificati non presentino le stesse capacità di sviluppo di quelli freschi.

In uno studio multicentrico di coorte (123) viene evidenziato come la vitrificazione sia un metodo sicuro ed efficace per la crioconservazione di ovociti umani allo stadio MII riportando tassi di nati vivi del 29,4%. Nel protocollo asettico da noi utilizzato le percentuali di nati vivi ottenute (36,0%) nel primo trial risultano simili a quelle ottenute da loro ed i risultati biologici e clinici promettenti e scientificamente accettabili.

Per cui anche se dimostrata la validità della vitrificazione rispetto al congelamento lento, i risultati rimangono ancora in parte significativamente bassi rispetto a quelli ottenuti da ovociti freschi.

A riprova che ci fosse spazio per migliorare il metodo di vitrificazione con sistema aperto inducendoci ad indagare le possibilità di raggiungere gli stessi risultati con un sistema chiuso abbiamo riscontrato uno studio di un gruppo di ricercatori spagnoli (106) che mostra risultati simili a quelli ottenuti da ovociti freschi.

Al fine di verificare la possibilità di vitrificare gli ovociti in modo asettico mantenendo le loro caratteristiche inalterate, abbiamo istituito un secondo trial clinico 2.

In questo studio abbiamo confrontato outcome clinici di ovociti freschi provenienti da stessa donatrice vs ovociti vitrificati con metodo chiuso. Questo studio prospettico comparativo ha portato due importanti risultati.

In primo luogo mostra ovociti freschi ed ovociti vitrificati in modo asettico hanno simili potenzialità di sviluppo, impianto, gravidanza e tassi di nati vivi in cicli di ovodonazione. In secondo luogo, questi risultati dimostrano come i bassi tassi di raffreddamento, prodotti nei sistemi di vitrificazione determinati anche dal termo-isolamento, non siano dannosi o letali per le cellule.

Al fine di eliminare eventuali influenze legate all'età delle pazienti ed alla stimolazione ovarica, sono state incluse pazienti riceventi ovociti dalla medesima donatrice.

Il tutto al fine di dimostrare come ovociti vitrificati possono essere di buona qualità e con tassi di natalità simili ad ovociti freschi.

La tecnica di vitrificazione aperta in un programma di ovodonazione (106) ha riportato risultati simili tra ovociti freschi e vitrificati. Così come riportati, (129) risultati comparabili ottenuti con ovociti vitrificati con tecnica open.

Il Trials 2 ha dimostrato come lo stesso risultato potrebbe essere raggiunto utilizzando il nostro dispositivo di vitrificazione chiuso (120). Tassi d'impianto, gravidanza clinica ed in corso similari tra ovociti di stessa provenienza vitrificati e freschi. Il tutto rispettando i requisiti di qualità tissutali secondo la direttiva europea 2004/23, 2006/17 / EG, e 2006/86 /CE (Parlamento europeo e il Consiglio dell'Unione europea, 2004, 2006), senza influenzare il risultato finale.

Il tasso di sopravvivenza del gruppo di vitrificazione è risultato del 92,5%. Questo risultato è simile a quelli riportati negli studi con metodica aperta (106) riportati in una recente revisione sistematica e meta-analisi (120). Fecondazione, scissione e tassi di scissione blastocistica risultati simili tra i due gruppi ed in accordo con i più recenti studi utilizzando ovociti vitrificati.

L'attuale studio ha rivelato un tasso statisticamente maggiore di blastocisti di qualità superiore nel gruppo con ovociti freschi rispetto al gruppo vitrificazione. Anche se questa differenza non ha influenzato in alcun modo gli outcome clinici osservata, una lieve riduzione statistica nelle gravidanze biochimiche da ovociti vitrificati rispetto ad ovociti freschi.

Recentemente è stato riportato che gli embrioni provenienti da ovociti vitrificati avessero un diverso modello di sviluppo embrionale precoce rispetto a quelli derivati da ovociti freschi (130). Inoltre, è stato evidenziato (131) che gli ovociti vitrificati hanno insufficienze citoplasmatiche che potrebbe non supportare la fecondazione e lo sviluppo embrionale nelle prime fasi. Ovviamente queste due proposte potrebbero essere utili per

spiegare il nostro tasso più basso di qualità blastocistica in embrioni ottenuti da ovociti vitrificati. In caso contrario, dovremmo assumere che questa differenza potrebbe essere una scoperta casuale che potrebbe scomparire in uno studio in scala più grande o sostenere che la morfologia non è un criterio affidabile per valutare la competenza blastocistica. Combinando il tasso più basso di blastocisti di alta qualità con il più basso tasso di gravidanza biochimica ottenuto nel gruppo vitrificato, ciò ha portato alla supposizione che la vitrificazione potrebbe essere un utile filtro per eliminare ovociti di dubbia qualità in grado di essere fecondati e raggiungere lo stadio di blastocisti ma non l'impianto e quindi non in grado di sviluppare una gravidanza normale. Indicativamente la vitrificazione ovocitaria potrebbe bloccare lo sviluppo degli embrioni destinati allo sviluppo di una gravidanza biochimica.

Chiaramente ulteriori studi prospettici sono necessari a conferma di questa ipotesi. A nostra conoscenza, questo lavoro è l'unico studio prospettico con le seguenti caratteristiche: I) studio prospettico con randomizzazione, II) Ovodonazione da medesima donatrice, III) confronto tra un gruppo fresco e un gruppo di vitrificazione, IV) vitrificazione ovocitaria eseguita in un sistema chiuso asettico, V) in entrambi i gruppi, effettuata coltura embrionale e loro ET allo stadio di blastocisti. Pertanto consideriamo questi risultati di grande importanza.

Concludendo che il sistema di vitrificazione chiuso è una tecnica efficace per la vitrificazione di ovociti in condizioni asettiche non arrecando alcuna preoccupazione per la sicurezza biologica del tessuto umano vitrificato.

Lo sviluppo di un protocollo di vitrificazione asettico affidabile e sicuro è di grande importanza per la crioconservazione dei tessuti umani dopo le relazioni di Bielański (132,133,93) che hanno sollevato lo scetticismo sull'uso di protocolli di vitrificazione aperti. Le linee guida del Parlamento europeo (Parlamento europeo e il Consiglio dell'Unione europea, 2004, 2006) hanno spinto i ricercatori alla ricerca di soluzioni per mantenere la vitrificazione in condizioni asettiche. Pensiamo ad esempio all'azoto liquido sterilizzato mediante filtrazione (134) o irradiazione di UV (96) o la conservazione di campioni in vapori di azoto (135,95) al fine di risolvere il problema determinato dall'utilizzo di dispositivi aperti. Anche se in parte i sistemi chiusi sono stati considerati potenzialmente dannosi per le cellule a causa delle più basse velocità di raffreddamento, i nostri risultati dimostrano che i sistemi di vitrificazione chiusi sono sicuri e possono essere usati come dispositivi per raccogliere campioni biologici senza rischi.

Al giorno d'oggi, le indicazioni per la crioconservazione degli ovociti sono certamente in

aumento. Il Social Freezing ovocitario e le banche per ovodonazione risultano utilizzabili con buona frequenza dal momento che gli ovociti vitrificati sembrano avere le stesse potenzialità in termini di fertilizzazione ed impianto rispetto ad ovociti freschi.

La principale nostra preoccupazione risulta essere quella di crioconservare il materiale biologico nel modo più sicuro. Un dispositivo di sistema chiuso può garantire l'appropriato isolamento da qualunque fattore negativo, sostanze tossiche a basso peso molecolare che si trovano in azoto liquido, la cui durata d'azione non è nota. Nel nostro studio abbiamo ottenuto risultati molto promettenti utilizzando la scelta più sicura per la conservazione degli ovociti in azoto liquido.

Tutto ciò ha dato sicuramente un grande impulso agli studi nell'ambito delle biotecnologie della riproduzione umana. Per di più l'introduzione di nuove tecniche che utilizzano cellule staminali per migliorare l'impianto o indurre la generazione di gameti sono ad oggi oggetto di dibattito. L'utilizzo di cellule staminali crioconservate sono a nostra maniera di vedere procedure che dovrebbero essere effettuate i regimi di estrema e rigorosa sicurezza ed il contributo scientifico di questa tesi potrebbe aiutare nel prendere in considerazione il sistema di vitrificazione chiuso per questo tipo di cellule.

BIBLIOGRAFIA

1. Luyet B. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodynamics*. 1937; 1:1–14.
2. Luyet B. Working hypotheses on the nature of life. *Biodynamics*. 1934;(1):1–7.
3. Luyet B, Gonzales F. Growth of nerve tissue after freezing in liquid nitrogen. *Biodynamica*. 1953 Dec;7(141–144):171–4.
4. Lovelock JE, Polge C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem J*. 1954 Dec;58(4):618–22.
5. Lovelock JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*. 1959 May 16;183(4672):1394–5.
6. Rapatz G, Luyet B. Patterns of ice formation in aqueous solutions of glycerol. *Biodynamica*. 1966 Dec;10(198):69–80.
7. Chang M. Fertilizability of rabbit ova and the effects of temperature in vitro on their subsequent fertilization and activation in vivo. *J Exp Zool*. 1952; 121:351–81.
8. Sherman JK, Lin TP. Effect of glycerol and low temperature on survival of unfertilized mouse eggs. *Nature*. 1958 Mar 15;181(4611):785–6.
9. Sherman JK, Lin TP. Survival of unfertilized mouse eggs during freezing and thawing. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. 1958 Sep;98(4):902–5.
10. Parkening TA, Tsunoda Y, Chang MC. Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J Exp Zool*. 1976 Sep;197(3):369–74.
11. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*. 1972 Oct 27;178(4059):411–4.
12. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci Pt 2 Biochem Gen Mol Biol*. 1972 Nov 22;11(22):1071–9.
13. Leibo SP, McGrath JJ, Cravalho EG. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology*. 1978 Jun;15(3):257–71.
14. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet Lond Engl*. 1986 Apr 19;1(8486):884–6.
15. van Uem JF, Siebzehrübl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet Lond Engl*. 1987 Mar 28;1(8535):752–3.
16. Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ, Downey BR. In vitro fertilization and

- development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*. 1992 Aug;29(4):485–92.
17. Tucker MJ, Wright G, Morton PC, Massey JB. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil Steril*. 1998 Sep;70(3):578–9.
 18. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2001 Mar;16(3):411–6.
 19. Borini A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C, Coticchio G. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2006 Feb;21(2):512–7.
 20. Ledda S, Bogliolo L, Succu S, Ariu F, Bebbere D, Leoni GG, et al. Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival. *Reprod Fertil Dev*. 2007;19(1):13–23.
 21. Karow AM, Critser JK. *Reproductive Tissue Banking: Scientific Principles*. Academic Press; 1997. 472 p.
 22. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*. 1985 Feb 14;313(6003):573–5.
 23. Wood MJ, Barros C, Candy CJ, Carroll J, Melendez J, Whittingham DG. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethylsulphoxide. *Biol Reprod*. 1993 Sep;49(3):489–95.
 24. Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1987 Nov;2(8):695–700.
 25. Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, et al. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*. 1990 May 10;345(6271):170–2.
 26. Mazur P, Cole KW, Hall JW, Schreuders PD, Mahowald AP. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1932–5.
 27. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod*. 1996 May;54(5):1059–69.
 28. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 1998 Sep;51(1):53–8.
 29. Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*. 2000 Aug;63(2):513–8.
 30. Papis K, Shimizu M, Izaike Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes

- vitrified in droplets. *Theriogenology*. 2000 Sep 15;54(5):651–8.
31. Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2001 Nov;16(11):2350–6.
 32. Lane M, Gardner DK. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol Reprod Dev*. 2001 Mar;58(3):342–7.
 33. Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*. 2001 Mar;42(2):139–44.
 34. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Feb 22;187(1–2):77–81.
 35. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2005 Sep;11(3):300–8.
 36. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril*. 2006 Jan;85(1):108–11.
 37. Yoon TK, Lee DR, Cha SK, Chung HM, Lee WS, Cha KY. Survival rate of human oocytes and pregnancy outcome after vitrification using slush nitrogen in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*. 2007 Oct;88(4):952–6.
 38. Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-Jaffe M, Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology*. 2007 Jan 1;67(1):64–72.
 39. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*. 2007 Jan 1;67(1):73–80.
 40. Eroglu A, Toner M, Toth TL. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil Steril*. 2002 Jan;77(1):152–8.
 41. Stachecki JJ, Cohen J, Willadsen SM. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. *Cryobiology*. 1998 Dec;37(4):346–54.
 42. Horvath G, Seidel GE. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology*. 2006 Sep 1;66(4):1026–33.
 43. Gook DA, Osborn SM, Bourne H, Johnston WI. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1994 Apr;9(4):684–91.
 44. Porcu E, Fabbri R, Petracchi S, Ciotti PM, Flamigni C. Ongoing pregnancy after

- intracytoplasmic injection of testicular spermatozoa into cryopreserved human oocytes. *Am J Obstet Gynecol*. 1999 Apr;180(4):1044–5.
45. Chian R-C, Huang JYJ, Tan SL, Lucena E, Saa A, Rojas A, et al. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008 May;16(5):608–10.
 46. Manipalviratn S, Decherney A. Clinical application of human oocyte cryopreservation. *Rev Recent Clin Trials*. 2008 May;3(2):104–10.
 47. Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2005. *Morb Mortal Wkly Rep Surveill Summ Wash DC 2002*. 2008 Jun 20;57(5):1–23.
 48. Fuller BJ, Lane N, Benson EE. *Life in the Frozen State*. CRC Press; 2004. 699 p.
 49. Leibo SP. Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova. *J Membr Biol*. 1980;53(3):179–88.
 50. Benson CT, Critser JK. Variation of water permeability (Lp) and its activation energy (Ea) among unfertilized golden hamster and ICR murine oocytes. *Cryobiology*. 1994 Jun;31(3):215–23.
 51. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril*. 1990 Jul;54(1):102–8.
 52. Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH, Quick SJ. Dimethylsulphoxide affects the organisation of microfilaments in the mouse oocyte. *Mol Reprod Dev*. 1990 Jul;26(3):227–35.
 53. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*. 1963 Nov; 47:347–69.
 54. Karran G, Legge M. Non-enzymatic formation of formaldehyde in mouse oocyte freezing mixtures. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1996 Dec;11(12):2681–6.
 55. Vincent C, Garnier V, Heyman Y, Renard JP. Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fertil*. 1989 Nov;87(2):809–20.
 56. Van der Elst J, Nerinckx S, Van Steirteghem AC. In vitro maturation of mouse germinal vesicle-stage oocytes following cooling, exposure to cryoprotectants and ultrarapid freezing: limited effect on the morphology of the second meiotic spindle. *Hum Reprod Oxf Engl*. 1992 Nov;7(10):1440–6.
 57. George MA, Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH. The distribution of alpha- and gamma-tubulin in fresh and aged human and mouse oocytes exposed to cryoprotectant.

Mol Hum Reprod. 1996 Jun;2(6):445–56.

58. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*. 1990 Jun;27(3):247–68.

59. Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells. *Fed Proc*. 1965 Apr;24:S175–182.

60. Kleinhans FW, Mazur P. Comparison of actual vs. synthesized ternary phase diagrams for solutes of cryobiological interest. *Cryobiology*. 2007 Apr;54(2):212–22.

61. Mazur P, Schmidt JJ. Interactions of cooling velocity, temperature, and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast. *Cryobiology*. 1968 Aug;5(1):1–17.

62. Luyet BJ. Physical Changes Occurring in Frozen Solutions During Rewarming and Melting. In: Wolstenholme GEW, O'Connor eve, editors. *Ciba Foundation Symposium - The Frozen Cell* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd.; 1970 [cited 2016 Feb 21]. p. 27–50. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470719732.ch3/summary>

63. Mazur P. Slow-freezing injury in mammalian cells. *Ciba Found Symp*. 1977 Jan 18;(52):19–

64. Shaw PW, Bernard AG, Fuller BJ, Hunter JH, Shaw RW. Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effects of varying exposure times on survival. *Mol Reprod Dev*. 1992 Oct;33(2):210–4.

65. Ali J, Shelton JN. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J Reprod Fertil*. 1993 Nov;99(2):471–7.

66. Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J Reprod Fertil*. 1987 Jul;80(2):499–504.

67. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*. 1984 Aug;21(4):407–26.

68. Arav A. Vitrification of oocytes and embryos. In: Lauria A, Gandolfi F, eds *New Trends in Embryo Transfer*. UK: Portland Press; 1992. p. 255–64.

69. Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online*. 2003 Dec;7(6):623–33.

70. Luyet B, Hodapp E. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1938;39: 433–4.

71. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949 Oct 15;164(4172):666.

72. Kono T, Kwon OY, Nakahara T. Development of vitrified mouse oocytes after in

- vitro fertilization. *Cryobiology*. 1991 Feb;28(1):50–4.
73. Gook DA, Edgar DH. Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update*. 2007 Dec;13(6):591–605.
74. Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006 Jul;86(1):70–80.
75. Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2006 Jun;12(6):779–96.
76. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril*. 2008 Jun;89(6):1657–64.
77. Wallace WHB, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol*. 2005 Apr;6(4):209–18.
78. Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB, Martin FI. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. *N Engl J Med*. 1973 Nov 29;289(22):1159–62.
79. Elizur SE, Chian RC, Pineau CA, Son WY, Holzer HEG, Huang JYJ, et al. Fertility preservation treatment for young women with autoimmune diseases facing treatment with gonadotoxic agents. *Rheumatol Oxf Engl*. 2008 Oct;47(10):1506–9.
80. Elizur SE, Chian R-C, Holzer HEG, Gidoni Y, Tulandi T, Tan SL. Cryopreservation of oocytes in a young woman with severe and symptomatic endometriosis: a new indication for fertility preservation. *Fertil Steril*. 2009 Jan;91(1):293.e1-3.
81. Kavoussi SK, Fisseha S, Smith YR, Smith GD, Christman GM, Gago LA. Oocyte cryopreservation in a woman with mosaic Turner syndrome: a case report. *J Reprod Med*. 2008 Mar;53(3):223–6.
82. Cobo A, Garrido N, Crespo J, José R, Pellicer A. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reprod Biomed Online*. 2012 Apr;24(4):424–32.
83. Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online*. 2004 Aug;9(2):152–63.
84. Jain J, Paulson R. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2006 Oct;86(4):1037–46.
85. Nagy ZP, Chang C-C, Shapiro DB, Bernal DP, Kort HI, Vajta G. The efficacy and safety of human oocyte vitrification. *Semin Reprod Med*. 2009 Nov;27(6):450–5.
86. Quinn P. Suppression of ice in aqueous solutions and its application to vitrification in assisted reproductive technology. In: Chian RC, Quinn P (eds) *Fertility Cryopreservation*. Cambridge: Cambridge University Press; 2010. p. 10–5.

87. Kasai M, Edashige K. Movement of water and cryoprotectants in mouse oocytes and embryos at different stages: relevance to cryopreservation. In: Chian RC, Quinn P (eds) *Fertility Cryopreservation*. Cambridge: Cambridge University Press; 2010. p. 16–23.
88. Maneiro E, Ron-Corzo A, Julve J, Goyanes VJ. Surface area/volume ratio and growth equation of the human early embryo. *Int J Dev Biol*. 1991 Jun;35(2):139–43.
89. Seki S, Mazur P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. *Biol Reprod*. 2008 Oct;79(4):727–37.
90. Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology*. 2009 Aug;59(1):75–82.
91. Fahy GM, Levy DI, Ali SE. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology*. 1987 Jun;24(3):196–213.
92. Vajta G, Rienzi L, Ubaldi FM. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online*. 2015 Apr;30(4):325–33.
93. Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology*. 2012 Feb;77(3):467–82.
94. Cobo A, Bellver J, de los Santos MJ, Remohí J. Viral screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of oocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2012 Jan;97(1):74–8.
95. Cobo A, Romero JL, Pérez S, de los Santos MJ, Meseguer M, Remohí J. Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril*. 2010 Oct;94(5):1903–7.
96. Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Filicori M. Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil Steril*. 2010 Sep;94(4):1525–8.
97. Grout BWW, Morris GJ. Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology*. 2009 Apr 15;71(7):1079–82.
98. Yan J, Suzuki J, Yu X-M, Qiao J, Kan FWK, Chian R-C. Effects of duration of cryo-storage of mouse oocytes on cryo-survival, fertilization and embryonic development following vitrification. *J Assist Reprod Genet*. 2011 Jul;28(7):643–9.
99. AbdelHafez F, Xu J, Goldberg J, Desai N. Vitrification in open and closed carriers at different cell stages: assessment of embryo survival, development, DNA integrity and stability during vapor phase storage for transport. *BMC Biotechnol*. 2011; 11:29.

100. Vanderzwalmen P, Ectors F, Grobet L, Prapas Y, Panagiotidis Y, Vanderzwalmen S, et al. Aseptic vitrification of blastocysts from infertile patients, egg donors and after IVF. *Reprod Biomed Online*. 2009 Nov;19(5):700–7.
101. Official Journal of the European Union. DIRECTIVE 2004/23/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells EUR-Lex - L:2004:102:TOC - EN - EUR-Lex. [cited 2016 Mar 29]; Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2004:102:TOC>
102. Food and Drug Administration. Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products; Donor Screening and Testing, and Related Labeling. [Internet]. Available from: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2007-06-19/pdf/E7-11795.pdf>.
103. Zhou GB, Li N. Bovine oocytes cryoinjury and how to improve their development following cryopreservation. *Anim Biotechnol*. 2013;24(2):94–106.
104. Association of Clinical Embryologists and British Fertility Society, Cutting R, Barlow S, Anderson R. Human oocyte cryopreservation: evidence for practice. *Hum Fertil Camb Engl*. 2009;12(3):125–36.
105. Alpha Scientists In Reproductive Medicine. The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online*. 2012 Aug;25(2):146–67.
106. Cobo A, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2010 Sep;25(9):2239–46.
107. Cobo A, Serra V, Garrido N, Olmo I, Pellicer A, Remohí J. Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes. *Fertil Steril*. 2014 Oct;102(4):1006–1015.e4.
108. Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril*. 2013 Jan;99(1):37–43.
109. Vajta G, Nagy ZP, Cobo A, Conceicao J, Yovich J. Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion. *Reprod Biomed Online*. 2009;19 Suppl 3:1–7.
110. Prapas N, Prapas Y, Panagiotidis Y, Prapa S, Vanderzwalmen P, Makedos G. Cervical dilatation has a positive impact on the outcome of IVF in randomly assigned cases having two previous difficult embryo transfers. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2004

Aug;19(8):1791–5.

111. World Health Organization, editor. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. 271 p.
112. Prapas Y, Panagiotidis I, Kalogiannidis I, Gjata E, Papatheodorou A, Prapa S, et al. Double GnRH-antagonist dose before HCG administration may prevent OHSS in oocyte-donor cycles: a pilot study. *Reprod Biomed Online*. 2010 Aug;21(2):159–65.
113. Veeck LL. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology*. Taylor & Francis; 1999. 230 p.
114. Gardner D, Schoolcraft W. In vitro culture of human blastocyst. In: *Towards Reproductive Certainty: Infertility and Genetics Beyond*. Parthenon Press, Carnforth; 1999. p. 378–388.
115. Prapas Y, Prapas N, Hatziparasidou A, Prapa S, Nijs M, Vanderzwalmen P, et al. The echoguide embryo transfer maximizes the IVF results. *Acta Eur Fertil*. 1995 Jun;26(3):113–5.
116. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2009 Nov;24(11):2683–7.
117. Panagiotidis Y, Vanderzwalmen P, Prapas Y, Kasapi E, Goudakou M, Papatheodorou A, et al. Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte-donation programme: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*. 2013 May;26(5):470–6.
118. Prapas N, Prapas Y, Panagiotidis Y, Prapa S, Vanderzwalmen P, Schoysman R, et al. GnRH agonist versus GnRH antagonist in oocyte donation cycles: a prospective randomized study. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2005 Jun;20(6):1516–20.
119. Vanderzwalmen P, Zech N, Prapas Y, Panagiotidis Y, Papatheodorou A, Lejeune B, et al. [Closed carrier device: a reality to vitrify oocytes and embryos in aseptic conditions]. *Gynécologie Obstétrique Fertil*. 2010 Sep;38(9):541–6.
120. Papatheodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y, Prapas N, Zikopoulos K, Georgiou I, et al. Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Reprod Biomed Online*. 2013 Jun;26(6):595–602.
121. Paffoni A, Guarneri C, Ferrari S, Restelli L, Nicolosi AE, Scarduelli C, et al. Effects of two vitrification protocols on the developmental potential of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2011 Mar;22(3):292–8.
122. Stoop D, De Munck N, Jansen E, Platteau P, Van den Abbeel E, Verheyen G, et al.

- Clinical validation of a closed vitrification system in an oocyte-donation programme. *Reprod Biomed Online*. 2012 Feb;24(2):180–5.
123. Rienzi L, Cobo A, Paffoni A, Scarduelli C, Capalbo A, Vajta G, et al. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2012 Jun;27(6):1606–12.
124. Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*. 2011 Aug;96(2):277–85.
125. Grifo JA, Noyes N. Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes: potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril*. 2010 Jan 15;93(2):391–6.
126. Prapas N, Tavaniotou A, Panagiotidis Y, Prapa S, Kasapi E, Goudakou M, et al. GnRH antagonists and endometrial receptivity in oocyte recipients: a prospective randomized trial. *Reprod Biomed Online*. 2009 Feb;18(2):276–81.
127. Prapas Y, Goudakou M, Matalliotakis I, Kalogeraki A, Matalliotaki C, Panagiotidis Y, et al. History of endometriosis may adversely affect the outcome in menopausal recipients of sibling oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2012 Nov 1;25(5):543–8.
128. Mazur P, Seki S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95° to $70,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and warmed at 610° to $118,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*. 2011 Feb;62(1):1–7.
129. Trokoudes KM, Pavlides C, Zhang X. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertil Steril*. 2011 May;95(6):1996–2000.
130. Chamayou S, Romano S, Alecci C, Storaci G, Ragolia C, Palagiano A, et al. Oocyte vitrification modifies nucleolar remodeling and zygote kinetics—a sibling study. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Apr;32(4):581–6.
131. Hosseini SM, Asgari V, Hajian M, Nasr-Esfahani MH. Cytoplasmic, rather than nuclear-DNA, insufficiencies as the major cause of poor competence of vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2015 May;30(5):549–52.
132. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 2000 Mar;40(2):110–6.
133. Bielanski A, Bergeron H, Lau PCK, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 2003 Apr;46(2):146–52.
134. Lin L, Yu Y, Zhang X, Yang H, Bolund L, Callesen H, et al. Aseptic minimum volume vitrification technique for porcine parthenogenetically activated blastocyst. *Cryo*

Letters. 2011 Feb;32(1):62–8.

135. Eum JH, Park JK, Lee WS, Cha KR, Yoon TK, Lee DR. Long-term liquid nitrogen vapor storage of mouse embryos cryopreserved using vitrification or slow cooling. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5):1928–32.