

Tecnobios
Procreazione
Symposium **2007**
e

1° Congresso Nazionale

Società Italiana di Conservazione della Fertilità PRO-FERT

CASTELBRANDO
CISON DI VALMARINO (TV)

INCONTRO STAMPA

**TECNOBIOS PROCREAZIONE
SYMPOSIUM 2007**

**GIOVEDI' 13 SETTEMBRE
ORE 15,00**

Intervengono:

ANDREA BORINI
CARLO FLAMIGNI
FILOMENA GALLO
SILVIA GARAGNA
MARINA MENGARELLI
GUGLIELMO RAGUSA

COMUNICATO STAMPA

E' stato detto molte volte e non solo da noi: la legge 40/2004 è punitiva per le pazienti. Ma ormai c'è, e le possibilità che venga cambiata sono quasi nulle.

E allora che fare, per continuare ad essere "dalla parte delle donne"?

E' questo l'interrogativo cui Tecnobios Procreazione vuole rispondere con il:

Symposium 2007

che si terrà a Castelbrando - Cison di Valmarino, Treviso

dal 13 al 15 settembre.

Nuove frontiere della scienza che possano ammortizzare i danni della legge, attenzione alla prevenzione della sterilità, analisi delle richieste delle pazienti: i massimi esperti del settore si confronteranno su questi temi.

Per la prima volta ginecologi della P.M.A e oncologi insieme discuteranno sul problema della conservazione della fertilità nelle pazienti affette da malattie tumorali per trovare, con l'aiuto degli ultimi dati scientifici sulla terapia degli ovociti congelati, la soluzione migliore. Un decalogo preciso su chi deve davvero uscire dall' Italia per avere un bimbo in braccio e chi no, le indicazioni per scegliere il Centro più appropriato, i costi reali. Un consiglio, che è quasi un grido, per aggirare le maglie strette imposte dai legislatori: "Fate un ciclo all'estero con l'assistenza italiana poi rientrate con i vostri embrioni perché la legge italiana non lo vieta e permette alla donna di chiedere sempre il trasferimento dell'embrione in utero" sostiene Filomena Gallo, Presidente Associazione Amica Cicogna onlus."La volontà insomma di risolvere, quanto più possibile, i problemi delle pazienti, stando dalla loro parte" dichiara Marina Mengarelli, Presidente O.S.I..

“E’ questo ciò che un bravo medico deve fare, anche se la legge cerca di ostacolarlo” commenta Andrea Borini, Presidente Cecos e organizzatore del Convegno.”E la scienza, oggi, come sempre, ci può aiutare”.

Una nuova tecnica di congelamento degli ovociti messa a punto da Tecnobios Procreazione infatti, è in grado di migliorare sensibilmente i risultati della fecondazione assistita.

I dati ottenuti recentemente confermano i risultati degli studi preliminari del 2006: grazie alla nuova metodica aumentano la frequenza di sopravvivenza, la percentuale di fecondazione e la capacità di divisione cellulare degli ovociti dopo scongelamento.

Daniela Zucca
Ufficio Stampa Tecnobios Procreazione
Cell.338.8906266
daniela.zucca@tecnobiosprocreazione.it

Sintesi relazione

Andrea Borini

Presidente Cecos

Responsabile Clinico e Scientifico Tecnobios Procreazione

Una nuova tecnica di congelamento degli ovociti messa a punto da Tecnobios Procreazione è in grado di migliorare sensibilmente i risultati della fecondazione assistita. I dati ottenuti recentemente confermano i risultati degli studi preliminari del 2006: grazie alla nuova metodica aumentano la frequenza di sopravvivenza, la percentuale di fecondazione e la capacità di divisione cellulare degli ovociti dopo scongelamento. Attualmente, con le modifiche apportate al metodo di crioconservazione, il 76% degli ovociti riesce a sopravvivere alle basse temperature, il 76% viene fecondato con successo una volta scongelato e il 93% intraprende la divisione cellulare successiva alla fecondazione.

I nuovi dati, ottenuti su 90 cicli di scongelamento, sono sovrapponibili a quelli osservati negli studi precedenti e dimostrano che modificando il protocollo di conservazione è possibile migliorare le percentuali di successo della fecondazione assistita. Le capacità di impianto degli embrioni generati a partire da ovociti conservati con la tecnica messa a punto di recente è aumentata in maniera significativa rispetto al passato: si è passati dal 2,4-2,6% dei primi studi a oltre il 13%. Ogni 100 ovociti scongelati è possibile, ora, ottenere circa 6-7 impianti, un valore che potrebbe essere ulteriormente incrementato da successivi passi in avanti della ricerca.

La comunità scientifica internazionale vede con grande favore questi dati, tanto da averli inseriti come argomento di discussione nel prossimo congresso dell'American Society of Reproductive Medicine (ASRM) che si terrà il prossimo ottobre a Washington.

Pur non ritenendo definitivi i risultati di questi studi, la casistica analizzata, oltre 90 cicli, è già sufficiente per considerare la crioconservazione degli ovociti come una possibile e valida opzione per favorire il successo della fecondazione assistita. In generale le donne che si sottopongono alla PMA, e in particolare le pazienti con tumore che vogliono preservare la propria fertilità prima di sottoporsi alle terapie oncologiche avranno una possibilità in più di cui poter usufruire.

Chi deve rivolgersi ai centri esteri

- **Coppie che necessitano una donazione di ovociti**
- **Coppie che necessitano una donazione di seme**
- **Coppie portatrici di patologie genetiche**

- **Coppie con partner maschile con azoospermia non ostruttiva.** Gli spermatozoi testicolari hanno una più elevata possibilità di contenere alterazioni cromosomiche, DNA frammentato e difetti dello sviluppo citoplasmatico. Ovviamente per tutte queste ragioni è più probabile che durante la scelta dello spermatozoo da utilizzare per la ICSI venga accidentalmente scelto proprio quello anormale e quindi l'embrione che si formerà avrà meno possibilità di sviluppo. La possibilità di utilizzare più ovociti (dei 3 consentiti dalla legge) consente di ottenere più embrioni e quindi controllare le prime fasi di sviluppo e utilizzare quelli con migliore sviluppo. Consentire l'utilizzo di soli 3 ovociti porta ad un minor numero di embrioni ottenuti e, tra quelli a disposizione per il trasferimento, una alta quota di embrioni con diminuita possibilità di sviluppo. Da qui le diminuite percentuali di gravidanza in questo gruppo.

- **Coppie con partner maschile con severa oligoastenospermia e con aumentata percentuale di spermatozoi con DNA frammentato.** (Se non migliorati dopo terapia). Studi recenti hanno dimostrato che ICSI effettuate con spermatozoi con queste caratteristiche del DNA portano a percentuali di gravidanza significativamente inferiori e di aborto significativamente superiori. Anche in questo caso l'aumento di concentrazione di questo tipo di spermatozoi aumenta la possibilità di sceglierli per la ICSI e questo porta ad avere a disposizione meno embrioni con buone possibilità di sviluppo. Si è visto che una buona percentuale di pazienti migliora dopo terapie anti-ossidanti per cui uno screening per la frammentazione del DNA andrebbe fatta prima del ciclo di trattamento ICSI, se presente, prescritta una

terapia e se al controllo il numero di spermatozoi con frammentazione rimane alta si dovrebbe consigliare una ICSI all'estero.

- **Coppie la cui partner femminile ha più di 40 anni e produce più di 4-5 ovociti.** Anche in questo caso la diminuita possibilità di sviluppo degli embrioni, legata all'aumentata presenza di ovociti con alterazioni cromosomiche (nelle donne sopra i 40 anni sono aumentate), porta a risultati più bassi. Dopo i 40 anni si dovrebbero trasferire gli embrioni che dopo 3-4 giorni di coltura si sono sviluppati meglio. Sarebbe importante poter avere un alto numero di ovociti da utilizzare. Ovviamente è poco importante tutto questo per chi riesce a sviluppare un massimo di 4-5 ovociti perché comunque su questi numeri la selezione dei tre ovociti più maturi è già sufficiente.

Come scegliere il Centro

1. Internet non è sufficiente.
2. Visitare sempre il Centro e valutare le informazioni che vengono date.
3. Verificare il numero di cicli eseguiti dal Centro in un anno
4. Controllare i risultati del centro nella propria fascia di età
5. Chiedere sempre la percentuale di impianto per embrione; serve per capire se i dati delle percentuali di gravidanza sono veritieri (spesso a domande precise non si è preparati e questo comporta risposte non attinenti).
6. Diffidare della proposta di applicazione della diagnosi pre-impianto per lo screening delle aneuploidie sugli embrioni (viene detto che è una metodica per scegliere gli embrioni migliori): è stato dimostrato che non è utile.
7. Il congelamento degli embrioni dà migliori risultati quando l'embrione è in seconda giornata. Se il paziente vuole fare trattamenti con congelamento degli embrioni non dovrebbe accettare di fare il transfer in terza o quinta giornata: gli embrioni che si congelano hanno minori probabilità di successo.
8. Per trattamenti di donazione dei gameti andrebbe chiesto quali esami vengono eseguiti sui donatori/donatrici.
9. Per le donazioni di seme è fondamentale che venga osservato il periodo di sei mesi di congelamento per sottoporre nuovamente i donatori ed escludere la presenza di patologie virali (epatiti b e c e HIV).
10. Per le donazioni di ovociti i pericoli sono maggiori perché questi vengono utilizzati freschi e quindi è impossibile il controllo dopo sei mesi come viene fatto sugli spermatozoi. Forse sarebbe opportuno congelare gli embrioni ottenuti e richiedere dopo sei mesi la verifica degli esami per la donatrice; se ci si rivolge ad un centro con buoni risultati dal congelamento degli ovociti richiedere di congelare gli ovociti donati e poi utilizzarli solo dopo i sei mesi e la conferma che gli esami sono ancora negativi.

Perché le coppie Italiane dovrebbero rimanere in Italia per cercare di avere un Figlio con la fecondazione assistita?

di Filomena Gallo

Presidente Associazione Amica Cicogna Onlus

E' la domanda che mi sono posta all'indomani dell'entrata in vigore della legge 40/04, mentre ascoltavo tutte le previsioni disastrose dell'applicazione di tecniche mediche in regime di legge.

Tutte previsioni a danno di donna e nascituro, della coppia.

Durante il referendum, la determinazione dei medici che spiegavano perché la legge andava cambiata. Gli ultimi tre anni le continue sollecitazioni da parte del mondo scientifico a modifiche, hanno fatto prevalere la convinzione che le coppie italiane non possono andare all'estero.

Perché il far west che si voleva evitare in Italia prima della legge 40 non c'è mai stato, i centri Italiani erano tra i migliori in Europa per tecnologie, deontologia, risultati. Certo i casi scandalistici in ogni settore ci sono, determinati da mancanza di professionalità di pochi.

Oggi le coppie che vanno all'estero trovano tutto ciò che non c'è mai stato in Italia: abbiamo i supermarket della PMA, varietà di prezzi – tutti alti-, varietà di offerte – senza garanzie- , basta digitare su internet pma e scattano le vetrine pubblicitarie. Tutte con percentuali di successo dichiarate delle tecniche di PMA altissime 30%-40%. Ma questi centri stranieri sono diventati i migliori del mondo per magia?

Per le coppie tante speranze, illusioni, che fanno mettere i soldi da parte per un tentativo, sicuri della riuscita. Ma il più delle volte non è così. E intanto i costi delle tecniche per noi Italiani aumentano. E a volte si sceglie chi chiede di meno, ma si hanno le stesse garanzie sanitarie?

Le coppie si rivolgono ad Amica Cicogna, per avere indicazioni sui centri esteri, ma come possiamo noi dare indicazioni su centri che non conosciamo? Dove un dato solo certo abbiamo: gentilezza, cortesia, ma paghi anche il buongiorno che ti viene rivolto. Una nostra socia, dopo il primo tentativo fallito, non avendo i soldi per riprovarci, ha messo in vendita la sua casa, così ne compra una più piccola e con il resto dei soldi ci riprova.

E' dura dire che bisogna restare in Italia, anche perché mentre pronuncio questa affermazione so perfettamente che chi ha problemi di sterilità è un malato che ha problemi di tempo. Viviamo un immobilismo politico sul tema che fa pensare di vivere un incubo. Anche dopo la relazione al parlamento sulla Legge 40/04 del ministro della Salute, che presenta il fallimento della legge, sulla pelle dei malati.

Rimanere in Italia, azionando tutti gli strumenti in nostra difesa, denunce, autodenunce, combattere per il riconoscimento dei nostri diritti. Affidarsi a operatori

che ti seguono in ogni passo, per le tecniche consentite, appoggiare le loro azioni contro la legge 40, non buttare la spugna, altrimenti le cose non cambiano.

Coloro che sono stati esclusi dalla legge 40, per necessità si rivolgano all'estero, ma concordino con i medici italiani le domande da fare, cosa chiedere come garanzie.

Alle coppie di Amica Cicogna una cosa ho sempre consigliato, e molti hanno effettuato:

un ciclo all'estero con l'assistenza Italiana e il rientro in Italia con i propri embrioni, perché la legge Italiana non lo vieta e permette alla donna di chiedere sempre il trasferimento dell'embrione in utero.

Quali indicatori di qualità per un Centro di P.M.A.

Guglielmo Ragusa

Responsabile Centro Riproduzione Assistita

Ospedale San Paolo di Milano

Le tecniche di fecondazione assistita sono in una fase di continua evoluzione. Si tratta, infatti, di discipline molto giovani nelle quali il successo delle terapie dipende da un'ampia serie di fattori, alcuni dei quali sono più facilmente controllabili, perché per es. operatore-dipendenti, mentre altri lo sono decisamente molto meno. Per favorire il buon esito dei trattamenti è necessario, pertanto, che le procedure vengano condotte in condizioni ottimali sotto diversi punti di vista, in primo luogo quello clinico, ma non solo. Diversi elementi concorrono al raggiungimento del risultato finale e determinano la qualità del centro di fecondazione assistita. Identificare quali sono i fattori cruciali nella definizione del grado di eccellenza di un centro- gli indicatori di qualità- è importante non solo per gli specialisti del settore, che in questo modo possono avere dei riferimenti che li supportino nell'ottimizzazione delle strutture nelle quali operano, ma è rilevante anche per le coppie con problemi di sterilità al momento della scelta del centro al quale rivolgersi. I risultati clinici che un centro di fecondazione assistita è in grado di raggiungere costituiscono il principale indicatore di qualità. Il buon esito dei trattamenti dipende da diversi elementi: questi comprendono fattori strutturali e professionali che si aggiungono, ovviamente, alla risposta biologica della coppia infertile.

Per operare in maniera ottimale, un centro deve rispondere a criteri ben precisi:

- Deve disporre di strutture tecniche e strumentali adeguate.
- Gli specialisti- medici e biologi- devono avere una preparazione tale da poter sfruttare al meglio le potenzialità offerte dalle singole metodiche.
- Tutto il personale che opera nella struttura deve essere esclusivamente dedicato alla fecondazione assistita, come avviene normalmente nei centri privati ma meno frequentemente nei centri pubblici, dove spesso gli specialisti operano contemporaneamente in più di un ambito clinico.
- Anche il volume di attività, ovvero il numero di casi trattati nel centro, ha la sua importanza. Poiché l'esperienza influenza significativamente il raggiungimento dei risultati clinici, è ovvio che a offrire le maggiori garanzie di successo siano le strutture operanti su grandi numeri. Questo vale in assoluto per tutti i pazienti, ma è particolarmente importante per le coppie in cui la donna, avendo già un'età avanzata sotto il profilo riproduttivo, non ha molto tempo davanti a sé.
- L'igiene e l'adeguatezza delle strutture devono essere ottimali.
- Il materiale informativo a disposizione delle coppie, come peraltro il consenso informato, deve essere chiaro ed esauriente. In questo caso internet gioca un ruolo prioritario: il centro deve avere una buona accessibilità on-line.
- La completezza del percorso diagnostico e terapeutico del centro deve consentire alle coppie di effettuare presso lo stesso istituto le indagini e i trattamenti necessari al raggiungimento del risultato finale. In questo modo, si evitano spostamenti da un centro all'altro per eseguire questo o quel tipo di intervento non disponibile nella struttura a cui ci si è inizialmente rivolti, con minori disagi e perdite di tempo per le coppie.

- Altro elemento cruciale, valido soprattutto per i centri pubblici, sono le liste d'attesa che non devono essere troppo lunghe.
- Relativamente alla percentuale di successo di un centro, l'indicatore più attendibile è costituito dal numero di bambini nati per ciclo di trattamento. Tuttavia, le coppie spesso provengono da luoghi diversi, e una volta completato il ciclo di terapie ritornano nella zona di origine, sfuggendo frequentemente al follow up. Non è, quindi, agevole risalire ai bambini effettivamente nati in seguito alle tecniche di fecondazione assistita tanto che, a livello internazionale, si è adottato un altro parametro: il numero di gravidanze per trasferimento embrionale (transfer) in utero, considerato più attendibile nel rappresentare le capacità operative del centro. Le coppie possono reperire su internet stime realistiche sui risultati delle diverse tecniche di fecondazione assistita, cercando nei siti delle società scientifiche, dei centri italiani ed esteri d'eccellenza, nei siti delle associazioni di pazienti e nel sito del Registro Nazionale PMA dell'Istituto Superiore di Sanità (www.iss.it/rpma).
- La possibilità di congelare gli ovociti è un ulteriore parametro che concorre a definire la qualità del centro. Questa tecnica, pur essendo ancora in fase sperimentale, comincia a essere consolidata dalla casistica e si propone come una valida alternativa al congelamento degli embrioni. I costi, pur essendo elevati, sono giustificati dai tassi cumulativi di gravidanza che il congelamento degli ovociti consente di ottenere nei centri con maggiore esperienza nell'utilizzo della metodica.

Possono concordare il medico ed il paziente sul “momento di dire basta”?

di **Carlo Flamigni**

Università di Bologna

In linea di principio si dovrebbe assegnare al medico il compito di interrompere le terapie della sterilità nei casi nei quali non esistono probabilità di successo; quando queste probabilità sono molto basse, ma superiori a 0, il medico è tenuto a sconsigliare, in tutti i modi in cui questo è possibile senza diventare sgradevole per la dignità e per l'equilibrio psicologico della coppia, ed è suo preciso dovere ottenere un consenso informato che evidenzia la “futilità” dei tentativi. Si deve però accettare il fatto che ogni cittadino ha il diritto di andare alla ricerca di un successo anche quando le probabilità di trovarlo sono minime quando ritiene che questo successo sia fondamentale per la sua vita. Tutto ciò naturalmente vale per gli interventi che vengono eseguiti in centri privati: i centri pubblici hanno diritto di stabilire regole che escludano i trattamenti “futili” e che tengano conto, ad esempio, dell'età, del numero di cicli eseguiti senza successo, dei dati clinici e di laboratorio, e tutto ciò perché hanno l'obbligo di impegnare i fondi che hanno a disposizione, sempre limitati e insufficienti, nel modo più vantaggioso per la società. Ho scritto “in linea di principio” perché questa non può essere una norma e certamente molti operatori hanno deciso di comportarsi in modo diverso, seguendo comportamenti scelti in base a valutazioni deontologiche ed etiche che possono non essere condivise, ma non possono essere criticate.

In molti casi, invece, la decisione di smettere non viene influenzata dal medico, ma viene presa in modo autonomo dalla coppia. Questa scelta dipende prevalentemente dalle difficoltà incontrate dalla coppia nel corso del trattamento che possono riguardare incertezza e mancanza di controllo, pressioni familiari, personali sensazioni di disagio, sensazioni di disagio e modificazioni dell'equilibrio affettivo della coppia, impossibilità di far fronte agli impegni economici, gravi modificazioni della cenestesi indotte dalle cure, problemi burocratici, cattive relazioni con i medici, difficoltà nel lavoro (Y.Benjamin, *Fertility and Sterility*, 2005,83,275). Questo drop-out varia, nelle differenti casistiche, dal 15 all'82% e tende ad aumentare progressivamente con la ripetizione dei trattamenti. In molti studi di settore, poi, si

confonde il drop-out con la quota di coppie che sono semplicemente scomparse, per le più differenti ragioni, e che sono rintracciabili solo in parte (in media se ne può ritrovare traccia in non più del 25% dei casi).

Considerando la letteratura relativa a questo ultimo fenomeno, si scopre che molte coppie che cessano improvvisamente e senza lasciare traccia di sé di frequentare i centri, lo fanno perché, molto semplicemente, hanno cambiato domicilio; circa il 15% di queste pazienti ha iniziato spontaneamente una gravidanza e quasi il 20% ha deciso di smettere per ragioni collegate con una pressione psicologica considerata insopportabile. C'è una discussione sull'opportunità di interferire con questi problemi, che potrebbero far parte di un processo di autodifesa.

I medici hanno invece il compito di elaborare strategie per i casi di cattiva risposta ovarica alle stimolazioni ormonali, che hanno spesso a che fare con forme più o meno palesi di esaurimento ovarico prematuro o precoce. Molti dei protocolli usati in questi casi, sia che riguardino i trattamenti di stimolo, sia che abbiano a che fare con la permanenza nei terreni di coltura o la varie forme di trasfusione ooplasmatica, debbono essere considerate sperimentali e come tali presentate alle coppie.

Ugualmente sperimentali debbono essere considerati i progetti di conservazione di oociti o di tessuto ovarico che vengono offerti alle donne che debbono essere sottoposte a terapie che certamente toglieranno loro la fertilità: le gravidanze ottenute fino ad oggi in questi casi si contano sulle dita di una mano ed è molto discutibile che questa informazione non faccia parte del consenso informato.

Conservare la fertilità: progetti di vita, percorsi di vita

di **Marina Mengarelli**

Presidente O.S.I.

La possibilità di procreare dipende, in gran parte, per la donna, dall'età dei suoi ovociti: ma l'età della biologia non coincide con l'età sociale, e oggi accade sempre più spesso che le scelte di maternità si compiano, per ragioni sociali e culturali, in epoca successiva (l'età media alla quale si mette al mondo il primo figlio è in costante aumento).

Poter mettere via il proprio miglior patrimonio ovocitario diventa quindi importante, arrestare l'orologio biologico, almeno sotto il profilo dell'invecchiamento degli ovociti, può diventare una opportunità preziosa.

Le buone ragioni per CONSERVARE LA FERTILITA' sono anche altre; in aggiunta alle motivazioni socioculturali ci sono rilevanti motivazioni sanitarie.

CONSERVARE LA FERTILITA' diventa cruciale per le donne che si sottopongono a terapie per malattie oncologiche e sanno che diventeranno irreversibilmente sterili (questa possibilità esiste da molto tempo per gli uomini, che possono conservare il proprio seme).

CONSERVARE LA FERTILITA' è importante per le donne che, per patologie genetiche, sanno che andranno incontro ad un precoce esaurimento ovarico, la menopausa precoce è una sindrome che riguarda l'1,2% delle donne prima dei 40 anni.

Alcuni hanno detto che in fondo in questo modo non si fa che stipulare un POLIZZA DI ASSICURAZIONE CONTRO IL RISCHIO STERILITA'.

Forse si può dire così, ma a mio parere c'è dell'altro.

Le scelte di maternità sono ormai vincolate, in gran parte, a decisioni che hanno a che fare con la sopravvivenza e l'inserimento professionale della donna nel mondo del lavoro, ovvero derivano da circostanze e stili di vita che dipendono dal contesto sociale e dai modelli culturali che ci circondano.

Il rischio di ritrovarsi sterili o ipofertili quando ci potremo permettere di procreare, dipende dal luogo in cui viviamo, dal tempo in cui lavoriamo ed è nota ormai la correlazione diretta tra il benessere di una società e la partecipazione delle donne al mercato del lavoro.

Le donne che vivono e lavorano, oggi, in Italia, subiscono carichi di lavoro intra ed extradomestici come poche altre in Europa, hanno compagni poco sensibili alla condivisione dei carichi di lavoro familiari, hanno servizi sociali ancora insufficienti a permettere loro il lusso di scegliere la maternità senza pagare alcun prezzo.

In Italia si fanno pochi figli, il tasso di fecondità si muove debolmente, attorno a 1,3 figli per donna, per merito delle nuove cittadine.

Non c'è governo che a parole non abbia a cuore la famiglia, i figli, la maternità, ma le politiche sociali che dovrebbero sostenere le scelte delle persone e delle famiglie non sono mai sufficienti, per quanti sforzi si facciano.

In una situazione di questo tipo, allora, LA CONSERVAZIONE DELLA FERTILITA' cosa è davvero? Perché se è una POLIZZA CONTRO IL RISCHIO STERILITA' bisogna ragionare sulle CAUSE dell'esposizione al rischio e se le cause sono sanitarie i suoi costi dovrebbero essere A CARICO DELLO STATO, e se le cause sono derivate da stili di vita di cui subiamo le conseguenze, dovrebbero essere UGUALMENTE A CARICO DELLO STATO.

Se, invece, il paese in cui vivo, piuttosto che sostenermi nelle mie scelte, ostacola la mia libertà di espressione e decide che anche la Costituzione va interpretata in modo restrittivo, non si potrà aspettare in cambio molta collaborazione nei suoi progetti (invitare le donne italiane a fare figli prima, è offensivo, inefficace e viola la libertà della persona, starei attenta a sostenere questo punto, in particolare se donna e parlamentare).

E a proposito sarei proprio interessata a saperne di più sui costi reali che lo Stato Italiano paga per i cittadini sterili e per gli altri cittadini coinvolti oggi, dopo la legge 40, visti i discutibili risultati ottenuti, STIAMO FORSE SPENDENDO DI PIU' PER CURARE DI MENO ? Per far nascere meno bambini, fare più trattamenti, far aumentare le gravidanze multiple, quadruplicare i viaggi all'estero ? Gran bel risultato sulla pelle dei cittadini.

CONSERVARE LA FERTILITA' è una possibilità in più per avvicinare la vita vissuta alla vita sognata, pensata, immaginata, progettata.

Immaginare, progettare il proprio futuro e tentare di realizzarlo è quello che gli umani fanno da qualche milione di anni, è ciò che ci caratterizza come specie e fa di noi quello che siamo.

Niente di più, niente di meno.

Quali ostacoli nei tumori sensibili agli estrogeni

Lino Del Pup

Unità Operativa Oncologia Ginecologica Istituto Nazionale Tumori di Aviano

I trattamenti antitumorali possono condizionare negativamente la fertilità della donna. Chemioterapia, radioterapia- o la loro combinazione- oppure interventi chirurgici demolitivi come l'asportazione delle ovaie possono indurre una sterilità irreversibile sulla quale fino a poco tempo fa non si poteva intervenire. Ora le possibilità di preservare la fertilità nelle pazienti oncologiche esistono, grazie ai progressi delle tecniche di fecondazione assistita. E' necessario, però, che vengano soddisfatti alcuni criteri molto importanti.

- Il fattore tempo è il più critico. Le pazienti che vogliono salvaguardare la propria fertilità prima di intraprendere un percorso terapeutico antitumorale devono iniziare ad attivarsi precocemente, già durante gli approfondimenti diagnostici, quando esiste un sospetto fondato della presenza di un tumore ma non ancora la certezza. Questo consente di giocare d'anticipo e di intraprendere eventuali trattamenti a salvaguardia della fertilità, come il congelamento degli ovociti o di porzioni di tessuto ovarico, senza dilazionare troppo l'inizio delle terapie oncologiche. Per giungere a questo obiettivo bisogna informare e sensibilizzare le donne sulla possibilità di intervenire a favore del desiderio di diventare madri anche se esiste il sospetto di un tumore. E' necessario diffondere le conoscenze anche tra i medici- soprattutto tra chi fa diagnosi precoce come i ginecologi o i radiologi- e tra gli oncologi delle possibilità offerte dalle nuove tecniche di fecondazione assistita in ambito oncologico. Le donne, attualmente, vengono informate troppo tardi di queste opportunità, quando ormai è più difficoltoso agire. Bisogna, invece, proporre precocemente alle pazienti con sospetto di tumore un percorso di preservazione della fertilità, quando si è ancora in tempo per attuarlo.
- I tumori che colpiscono più frequentemente le donne in età fertile sono le forme giovanili di neoplasia della mammella, i tumori che colpiscono l'utero (tumori endometriali) e l'ovaio. Poiché attualmente il tempo del primo figlio si è spostato in avanti e poiché questo tipo di tumori aumenta con il passare dell'età, molte pazienti oncologiche si trovano a non avere ancora soddisfatto il proprio desiderio di maternità. Le donne vanno rassicurate relativamente a

questo aspetto: le possibilità di guarigione dal tumore sono fortemente aumentate, quindi l'aspettativa di vita cresce sempre di più. Inoltre, una diagnosi precoce di tumore consente di avere il tempo necessario per intraprendere misure finalizzate alla preservazione della fertilità, senza inficiare l'efficacia dei trattamenti antitumorali.

- La maggior parte dei tumori che colpiscono le donne in età fertile, il tumore della mammella, dell'endometrio e dell'ovaio, sono ormono-sensibili: la loro crescita aumenta in presenza di estrogeni. Questo può costituire un limite ai trattamenti per la preservazione della fertilità. Esistono, però, farmaci alternativi agli estrogeni per l'induzione dell'ovulazione: tamoxifene e gli inibitori dell'aromatasi che non hanno un effetto estrogenico ma, al contrario, inibiscono l'azione di questo ormoni. Le donne vanno rassicurate riguardo all'esistenza di un'ampia gamma di trattamenti- in via di evoluzione e quindi di perfezionamento- che possono essere personalizzati e che le possono aiutare a non accantonare definitivamente il desiderio di avere un figlio anche in presenza di un tumore.

Architettura nucleare di embrioni preimpianto di topo ottenuti per fecondazione in vitro, partenogenesi o clonazione.

SILVIA GARAGNA ^{1,2}, VALERIA MERICO ¹, JESSICA BARBIERI ¹, MAURIZIO ZUCCOTTI ³, MARIO ZANONI¹, CARLO ALBERTO REDI ^{1,2}

¹ Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale e ²Centro di Eccellenza di Biologia Applicata, Università degli Studi di Pavia,

³ Sezione di Istologia ed Embriologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Parma,

I cromosomi, le regioni subcromosomiche ed i geni occupano regioni nucleari specifiche nei diversi tipi cellulari durante il differenziamento. I determinanti responsabili di questa organizzazione nucleare caratteristica di ogni tipo cellulare non sono noti. Abbiamo voluto indagare se le modificazioni epigenetiche del genoma (quali la metilazione del DNA, l'acetilazione e la metilazione degli istoni) possono influenzare l'acquisizione di una specifica organizzazione nucleare durante le prime fasi dello sviluppo preimpianto dell'embrione di topo. A questo proposito abbiamo studiato la localizzazione reciproca e nel volume nucleare di tre sub-regioni cromosomiche (i nucleoli, i centromeri e l'eterocromatina pericentromerica) utilizzando metodiche immunocitochimiche, dallo stadio di zigote fino allo stadio di morula, in embrioni ottenuti per fecondazione *in vitro* (embrioni IVF), per autoattivazione (embrioni partenogenetici, P) e per trasferimento di nuclei di cellule follicolari in citoplasmi di oociti enucleati (embrioni NT). Il genoma di questi tre tipi di embrioni ha un caratteristico corredo epigenetico che li contraddistingue.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza un pattern di localizzazione nucleare specifico, per le regioni analizzate, per ogni stadio di sviluppo. Subito dopo la fecondazione *in vitro*, l'attivazione partenogenetica o il trasferimento nucleare, i centromeri e le regioni pericentromeriche si localizzano attorno ai nucleoli nei nuclei di tutti e tre i tipi di embrione indipendentemente dalle loro differenze epigenetiche, sebbene

con frequenze diverse, indicando la capacita' dell'ooplasma di guidare il rimodellamento dell'architettura nucleare. Infatti, nel 41% degli embrioni NT, la tipica organizzazione di questo stadio non viene raggiunta. La frequenza di embrioni NT che non raggiungono lo stadio di 2 cellule (35%) e' molto simile alla frequenza di embrioni nei quale non avviene la riorganizzazione delle regioni analizzate, indicando che l'acquisizione di una determinata organizzazione spaziale del nucleo costituisce un vincolo necessario, ma non sufficiente, per il successivo sviluppo.

E' solo allo stadio di 8 cellule che la totalita' degli embrioni ottenuti per IVF, P e NT mostra lo stesso tipo di organizzazione delle regioni subnucleari studiate. I nostri risultati suggeriscono che l'epigenoma dei tre tipi di embrioni agisce solo parzialmente nel determinare l'organizzazione nucleare dei subcompartimenti analizzati.

Crioconservazione di oociti – Il passato ed il futuro

di Andrea Borini

Presidente Cecos

Responsabile Clinico e Scientifico Tecnobios Procreazione

Nella normale routine della PMA, la crioconservazione degli embrioni soprannumerari e il loro trasferimento in successivi cicli di scongelamento consente di limitare l'impiego di embrioni freschi, riducendo drasticamente il rischio di impianti multipli, e allo stesso tempo incrementando considerevolmente la probabilità di ottenere una gravidanza per ciclo di stimolazione. Il metodo convenzionale per la crioconservazione di embrioni è noto come "controlled rate freezing" o, in italiano, "congelamento lento". In breve, attraverso questo metodo l'embrione viene posto a contatto con soluzioni contenenti sostanze definite crioprotettori aventi lo scopo di deidratare l'ambiente cellulare e rendere minimo il rischio di danno cellulare derivante dalla formazione intracellulare di cristalli di ghiaccio durante la successiva riduzione di temperatura. Attraverso l'impiego di un cryofreezer programmabile, l'embrione viene poi portato molto lentamente a temperature progressivamente inferiori (fino a -40°C), al di sotto delle quali è possibile un rapido raffreddamento fino a valori vicini a quelli dell'azoto liquido, non sussistendo più il rischio di formazione di ghiaccio intracellulare. Una volta trasferito in azoto liquido l'embrione può essere conservato per un periodo anche molto lungo.

Talvolta, implicazioni di natura etica e/o giuridica possono rendere la crioconservazione di embrioni di difficile accettazione o inattuabile, come nel caso italiano. L'ovvia alternativa sarebbe quella di crioconservare gli oociti. L'idea non è certamente innovativa. Già oltre un ventennio orsono, ad un tempo in cui la crioconservazione di embrioni umani era una realtà, erano state riportate gravidanze ottenute con oociti crioconservati (Chen, 1986; Al-Hasani *et al.*, 1987). Tali tentativi ebbero però un carattere episodico, non avendo dimostrato che fosse possibile crioconservare gli oociti con la stessa efficienza con cui era possibile conservare gli embrioni. A quell'epoca, le difficoltà poste dalla crioconservazione di oociti non erano limitate alla specie umana. Nel 1977, Whittingham (1977) aveva ottenuto ridotte percentuali di fecondazione in oociti di topo crioconservati. Nella stessa specie, ancora nel 1989 Carroll *et al.* (1989) confermavano che la crioconservazione di oociti causasse una riduzione della percentuale di fecondazione, unitamente a importanti alterazioni (mancata estrusione del secondo globulo polare) del processo stesso di fecondazione. Emergeva così progressivamente la consapevolezza che in generale gli

oociti fossero una specie cellulare scarsamente resistente alla crioconservazione. Le possibili ragioni della particolare sensibilità degli oociti alla crioconservazione furono a quel tempo comprese solo in parte, ma si consolidò l'opinione che le grandi dimensioni cellulari, che limitano l'effetto deidratante dei crioprotettori, e la elevata sensibilità del citoscheletro alle basse temperature costituissero difficoltà quasi insormontabili. Pertanto, in assenza di risultati incoraggianti sia in campo clinico, sia in ambito sperimentale, la crioconservazione di oociti fu dimenticata per circa un decennio, anche per l'elevata efficacia garantita della crioconservazione di embrioni e la scarsità di oociti umani da destinare alla ricerca.

Nella seconda metà degli anni novanta si assistette ad un rinnovato interesse nella materia. Nel 1997 Porcu et al. (1997) riportavano il positivo completamento di una gravidanza ottenuta da un oocita crioconservato. Tale risultato clinico aveva seguito di pochi anni importanti progressi in campo sperimentale. Nel 1993, Carroll et al. (1993) aveva dimostrato che, attraverso opportune modifiche del protocollo di congelamento lento, fosse possibile ottenere in oociti di topo crioconservati percentuali di fecondazione e sviluppo pre- e post-impianto indistinguibili da quelle normalmente ottenute con oociti freschi. In tal modo, veniva sfatato il pregiudizio che gli oociti di mammifero non fossero crioconservabili in maniera efficiente. È difficile pensare che ciò non possa aver incoraggiato nuovi studi nella specie umana, pur considerate ovvie differenze (prima fra tutte le dimensioni) esistenti tra oociti murini e umani. L'atteggiamento rispetto alla crioconservazione di oociti cominciò a mutare, lentamente ma inesorabilmente. Tra la fine degli anni novanta e l'inizio del successivo decennio, furono pubblicate diverse esperienze (Polak de Fried *et al.*, 1998; Tucker *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1998, per citarne alcune). Ancora una volta questi studi ebbero un carattere episodico, essendo insufficiente l'approccio metodologico e scarsi conseguentemente i risultati. Emblematico in tal senso è lo studio di Tucker et al. (1998), in cui fu adottato un protocollo di crioconservazione obsoleto e oociti inadeguati alle finalità dell'indagine, ossia immaturi (allo stato di vescicola germinale) o "invecchiati" in vitro prima di essere utilizzati. La insufficienza del metodo di crioconservazione convenzionale, concepito in origine per gli embrioni allo stadio di 2-4 cellule, fu indiscutibilmente provata dal nostro gruppo con uno studio pubblicato solo nel 2004 (Borini *et al.*, 2004), ma in realtà derivante da un'esperienza iniziata fin dal 1996. Nel dettaglio, il nostro lavoro dimostrò che la crioconservazione eseguita secondo il metodo tradizionale incidesse negativamente sia sulle percentuali di sopravvivenza, sia su quelle di fecondazione. Il maniera però inaspettata, dai nostri dati emerse anche che, alle condizioni applicate, gli embrioni derivanti da oociti crioconservati avessero una

relativamente elevata capacità di impianto, tanto da generare percentuali di gravidanza degne di attenzione. Lo studio, per quanto non risolutivo, ebbe il merito di dimostrare che la crioconservazione di oociti fosse un'opzione di trattamento riproducibile in maniera sistematica, essendo stata applicata per la prima volta su un numero (68) piuttosto cospicuo di pazienti. Nel frattempo, la consapevolezza della necessità di nuovi protocolli di crioconservazione aveva stimolato nuovi studi di base. Nel 2001 (Fabbri *et al.*, 2001), era stata pubblicata l'importante osservazione secondo la quale nell'uomo la sopravvivenza oocitaria post-scongelo potesse essere considerevolmente aumentata (dal 35-40% al 70-75%) elevando la concentrazione del crioprotettore saccarosio nella miscela di crioconservazione. Nella specie murina, si era anche osservato che sostituendo il sodio con la colina (uno ione di pari carica elettrica rispetto al sodio, ma presumibilmente meno tossico), fosse possibile aumentare drasticamente le percentuali di sopravvivenza e fecondazione, insieme alla capacità di sviluppo pre- e post-impianto (Stachecki *et al.*, 1998). Questi progressi stimolarono ulteriori studi clinici (Boldt *et al.*, 2003; Fosas *et al.*, 2003) che suggerirono la possibilità di migliorare la resa della crioconservazione oocitaria in termini di sopravvivenza, capacità di fecondazione e sviluppo. Tuttavia, queste osservazioni non potevano essere ritenute in alcun modo affidabili, essendo state compiute su pochissime pazienti (meno di 15-20), condizioni in grado di influenzare grandemente sia i risultati di laboratorio, sia quelli clinici. L'interesse per la crioconservazione di oociti era in ogni caso in crescita. Nel 2005, Chen *et al.* (2005) pubblicarono un articolo basato sull'esito di venti cicli di congelamento-scongelo eseguiti con il metodo descritto da Fabbri *et al.* alcuni anni prima (2001). I risultati furono interessanti, consistendo in elevate percentuali di sopravvivenza (75%), fecondazione (67%) e impianto (11%). Inoltre, da un calcolo effettuato dagli autori, emerse che per ogni 100 oociti scongelati fosse possibile ottenere circa cinque impianti. È questo un dato concettualmente di importante rilievo, considerato che, nel caso degli embrioni congelati, da 100 oociti freschi di norma si ottengono circa quattro impianti (Gook and Edgar, 1999). Tuttavia, questi dati non furono confermati da un nostro recente studio (Borini *et al.*, 2006) generato con lo stesso metodo di crioconservazione. Nella nostra esperienza, se da un lato era confermata la possibilità di ottenere alte percentuali di sopravvivenza (74%), fecondazione (76%) e divisione degli oociti fecondati (90%), viceversa rimanevano deludenti le percentuali di impianto (5%). Calcolando inoltre la percentuale di impianto rispetto a 100 oociti scongelati emerse un valore (2.6%) alquanto modesto. Ciò mise in discussione la riproducibilità dei dati di Chen *et al.* (2005), anche se va detto che le

percentuali di impianto classicamente definite (ossia riferite al numero di embrioni trasferiti e non al numero di oociti scongelati) non sono direttamente confrontabili tra i due studi. Infatti, nel nostro caso era preclusa, per via della legge sulla PMA, la possibilità di generare più di tre embrioni e, pertanto, selezionare gli embrioni da trasferire, opzione viceversa sistematicamente applicata nello studio di Che et al.. Ciò nonostante, siamo del parere che i nostri dati siano alquanto più attendibili, essendo stati generati da un numero dieci volte maggiore di scongelamenti (201). Inoltre, è da ricordare uno studio pressoché concomitante di un altro gruppo italiano (Levi Setti *et al.*, 2006) basato su un numero altrettanto elevato di pazienti (159), e soprattutto in perfetta coerenza con i nostri risultati. Nell'ultimo anno, abbiamo esteso numericamente l'esperienza del nostro lavoro del 2006 (Borini *et al.*, 2006), confermando pienamente quanto già osservato. Il motivo per cui oociti che sopravvivono con alte percentuali al congelamento e sostengono il processo di fecondazione e divisione in maniera apparentemente normale non sono poi in grado di dar luogo ad una gravidanza evolutiva (Borini *et al.*, 2006; Levi Setti *et al.*, 2006) non è noto con certezza. Recentemente abbiamo però fornito una possibile spiegazione a tale incoerenza. Da anni, infatti, siamo attivi promotori di studi di base sulla crioconservazione degli oociti. Nel caso particolare del protocollo impiegato nel nostro studio del 2006 (Borini *et al.*, 2006), attraverso studi di microscopia elettronica abbiamo accertato che nonostante gli oociti sopravvivano apparentemente intatti alla crioconservazione, in realtà presentano importanti alterazioni dell'organizzazione cellulare interna, non visibile attraverso la microscopia convenzionale usata di routine nel laboratorio di PMA (Nottola *et al.*, 2006). È difficile sostenere con certezza una relazione di causa-effetto tra lesioni cellulari e compromessa capacità di impianto, tuttavia l'associazione è alquanto suggestiva. Su oociti crioconservati con lo stesso metodo, abbiamo condotto anche studi per osservare lo stato del citoscheletro. Attraverso tecniche di microscopia confocale, abbiamo appurato che la tanto temuta distruzione del fuso meiotico, ossia della struttura citoscheletrica che segrega i cromosomi e la cui disfunzione genera aneuploidie nell'embrione, in realtà non si verifica, almeno alle condizioni da noi verificate (Coticchio *et al.*, 2006). Ciò mette in discussione il "tabù" secondo cui il fuso meiotico, una volta esposto a basse temperature, invariabilmente va incontro a danni irreparabili.

Congelamento lento a parte, bisogna ricordare che negli ultimi 6-7 anni è stato messo alla prova modo alternativo di conservazione, noto come vitrificazione. Con questa modalità, invece che deidratare e ridurre lentamente la temperatura per impedire la formazione di ghiaccio intracellulare, si applicano transizioni di temperatura estremamente più rapide,

essenzialmente allo scopo di non lasciar tempo alle molecole d'acqua di organizzarsi in un reticolo cristallino, prevenendo pertanto la formazione di ghiaccio intra- o extracellulare. Per aumentare la viscosità della soluzione di vitrificazione e ostacolare ulteriormente la formazione di ghiaccio, si impiegano concentrazioni di crioprotettore molto più elevate rispetto al congelamento lento (fino 4-5 volte). Ciò però genera un importante rischio di tossicità, che costituisce uno degli aspetti più problematici di questo metodo. In alcuni casi, la vitrificazione è stata applicata per la crioconservazione di oociti umani, dopo essere stata adottata già da tempo in campo biotecnologico-zootecnico. Attualmente gli studi clinici pubblicati sull'argomento sono esigui (Yoon *et al.*, 2003; Kuwayama *et al.*, 2005; Lucena *et al.*, 2006), mentre le gravidanze descritte in articoli scientifici (peer-reviewed papers) sono state complessivamente poco più di trenta. Numericamente questi dati sono ancora modesti e pertanto non paragonabili a quelli generati attraverso i vari protocolli di congelamento lento. Per questa ragione, almeno per ora, appare poco comprensibile l'ottimismo sorto intorno alla vitrificazione, alimentato da alcuni ambienti scientifici (Kuleshova and Lopata, 2002) e veicolato dai media. In qualsiasi ambito medico-scientifico, l'efficacia di una tecnica è stimabile a patto che i risultati siano sufficientemente ampi e sistematicamente riproducibili, circostanze che non appaiono attualmente essere affatto applicabili alla vitrificazione degli oociti. Naturalmente ogni tentativo di progresso nella materia va incondizionatamente incoraggiato, ma appare azzardata e razionalmente infondata l'opinione secondo cui la vitrificazione costituisca già allo stato attuale soluzione al problema della crioconservazione di oociti.

Successivamente ad una serie di osservazioni da noi compiute sull'azione dei crioprotettori e sulle relative reazioni cellulari indotte negli oociti (Paynter *et al.*, 2005), abbiamo recentemente identificato un protocollo di crioconservazione alternativo (Bianchi *et al.*, 2007). Il metodo è stato verificato su una prima serie, piuttosto numerosa di cicli di scongelamento (90). In termini di frequenze di sopravvivenza (76%), fecondazione (76%) e divisione (93%), gli oociti crioconservati con questo metodo hanno generato frequenze del tutto comparabili a quelle ottenute nello studio del 2006 (Borini *et al.*, 2006). Tuttavia, la capacità di impianto è apparsa alquanto migliorata, superando il 13%. È questo un consistente miglioramento che in principio consentirebbe di ottenere circa 6-7 impianti per 100 oociti scongelati, valore ben maggiore rispetto al 2.4-2.6% ottenibile con i precedenti protocolli (Borini *et al.*, 2004; Borini *et al.*, 2006). Naturalmente si tratta di dati preliminari, per quanto comunque numericamente notevoli rispetto alla grande maggioranza di quelli di altre pubblicazioni prodotte sull'argomento. Essi dovranno essere estesi a serie più

ampie di pazienti, selezionando questi ultimi secondo criteri che non siano in grado di complicare l'interpretazione dell'esito clinico, e soprattutto verificati in maniera indipendente da altri gruppi di ricerca, per confermarne la riproducibilità.

Bibliografia

- Al-Hasani, S, Diedrich K, van der Ven H, Reinecke A, Hartje M and Krebs D. (1987) Cryopreservation of human oocytes. *Human Reproduction* 2,695-700.
- Bianchi, V, Coticchio G, Distratis V, Di Giusto N, Flamigni C and Borini A. (2007) Differential sucrose concentration during dehydration (0.2 mol/l) and rehydration (0.3 mol/l) increases the implantation rate of frozen human oocytes. *Reproductive Biomedicine Online* 14,64-71.
- Boldt, J, Cline D and McLaughlin D. (2003) Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. *Human Reproduction* 18,1250-1255.
- Borini, A, Bonu MA, Coticchio G, Bianchi V, Cattoli M and Flamigni C. (2004) Pregnancies and births after oocyte cryopreservation. *Fertility and Sterility* 82,601-605.
- Borini, A, Sciajno R, Bianchi V, Sereni E, Flamigni C and Coticchio G. (2006) Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. *Human Reproduction* 21,512-517.
- Carroll, J, Warnes GM and Matthews CD. (1989) Increase in digyny explains polyploidy after in-vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 85,489-494.
- Carroll, J, Wood MJ and Whittingham DG. (1993) Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. *Biol Reprod* 48,606-612.
- Chen, C. (1986) Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1,884-886.
- Chen, SU, Lien YR, Chen HF, Chang LJ, Tsai YY and Yang YS. (2005) Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Human Reproduction* 20,1975-1980.
- Coticchio, G, De Santis L, Rossi G, Borini A, Albertini D, Scaravelli G, Alecci C, Bianchi V, Nottola S and Cecconi S. (2006) Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation*. *Human Reproduction* 21,1771-1776.

- Fabbri, R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S and Flamigni C. (2001) Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Human Reproduction* 16,411-416.
- Fosas, N, Marina F, Torres PJ, Jove I, Martin P, Perez N, Arnedo N and Marina S. (2003) The births of five Spanish babies from cryopreserved donated oocytes. *Human Reproduction* 18,1417-1421.
- Gook, DA and Edgar DH. (1999) Cryopreservation of the human female gamete: current and future issues. *Human Reproduction* 14,2938-2940.
- Kuleshova, LL and Lopata A. (2002) Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 78,449-454.
- Kuwayama, M, Vajta G, Kato O and Leibo SP. (2005) Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 11,300-308.
- Levi Setti, PE, Albani E, Novara PV, Cesana A and Morreale G. (2006) Cryopreservation of supernumerary oocytes in IVF/ICSI cycles. *Human Reproduction* 21,370-375.
- Lucena, E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A and Lucena A. (2006) Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 85,108-111.
- Nottola, SA, Macchiarelli G, Coticchio G, Bianchi S, Cecconi S, De Santis L, Scaravelli G, Flamigni C and Borini A. (2006) Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations. *Human Reproduction*.
- Paynter, SJ, Borini A, Bianchi V, De Santis L, Flamigni C and Coticchio G. (2005) Volume changes of mature human oocytes on exposure to cryoprotectant solutions used in slow cooling procedures. *Human Reproduction* 20,1194-1199.
- Polak de Fried, E, Notrica J, Rubinstein M, Marazzi A and Gomez Gonzalez M. (1998) Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertility and Sterility* 69,555-557.
- Porcu, E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O and Flamigni C. (1997) Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertility and Sterility* 68,724-726.
- Stachecki, JJ, Cohen J and Willadsen SM. (1998) Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. *Cryobiology* 37,346-354.

- Tucker, MJ, Morton PC, Wright G, Sweitzer CL and Massey JB. (1998) Clinical application of human egg cryopreservation. *Human Reproduction* 13,3156-3159.
- Whittingham, DG. (1977) Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at --196 degrees C. *J Reprod Fertil* 49,89-94.
- Yoon, TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM and Cha KY. (2003) Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 79,1323-1326.
- Young, E, Kenny A, Puigdomenech E, Van Thillo G, Tiveron M and Piazza A. (1998) Triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved oocytes: case report. *Fertility and Sterility* 70,360-361.