



CONGRESSO – II SESSIONE | La scienza non è solo metodologia

## CRIOCONSERVAZIONE E VITRIFICAZIONE SVILUPPO E TECNICA DEI METODI

di Carlo Cirotto\*

**N**ell'armamentario del sapere popolare è presente una convinzione assai ben radicata: per conservare nel migliore dei modi e per tempi indefiniti qualsiasi materiale biologico è sufficiente mantenerlo a temperature basse, sotto lo zero. È però altrettanto diffusa la consapevolezza che le derrate alimentari, se lasciate troppo a lungo nei freezer domestici, perdono le loro caratteristiche organolettiche e non possono più essere consumate con tranquillità. Ciò avviene perché le reazioni di degradazione dei materiali biologici procedono comunque: il freddo non le inibisce, le rende soltanto più lente. Solo alla temperatura dello zero assoluto (-273°C) – impossibile, in concreto, da raggiungere – esse sono completamente bloccate.

La crioconservazione di materiali biologici di interesse scientifico, come cellule, embrioni e gameti, in azoto liquido (-196°C) non si sottrae a questa regola ed è per questo motivo che, dopo un certo numero di anni di conservazione, il campione risulta chimicamente tanto diverso dall'originale da non poter più essere utilizzato per gli scopi prefissati. Ed è per tale motivo che gli embrioni crioconservati da più di 5 anni di solito non vengono più utilizzati nelle tecniche di fecondazione artificiale. La loro capacità di attecchimento in utero infatti è drasticamente ridotta. Rimanendo, però, all'interno della finestra temporale dei 5 anni, la crioconservazione è tuttora l'unico metodo efficace per la conservazione dei materiali biologici. Altre possibili forme di mantenimento, come l'ipotermia e la liofilizzazione, non danno risultati altrettanto soddisfacenti.

Rallentare le reazioni di degradazione chimica non è, tuttavia, l'unica finalità delle tecniche di congelamento utilizzate in biologia. Si richiede infatti che, terminato il congelamento, le strutture biologiche siano in grado di riprendere la loro normale funzionalità e che sia quindi salvaguardata anche l'integrità strutturale delle cellule e della loro delicatissima organizzazione molecolare. Tale esigenza costringe a seguire procedimenti di raffreddamento del tutto particolari.

Un puro e semplice abbassamento della temperatura, infatti, avrebbe come conseguenza la trasformazione dell'acqua intra- e inter-cellulare in cristalli di ghiaccio che, crescendo, lacererebbero irreparabilmente le delicatissime architetture molecolari della vita cellulare oltre a produrre scompensi nella concentrazione delle soluzioni interne ed esterne alla cellula.

Intorno agli anni '70 del secolo scorso fu messa a punto una tecnica di congelamento lento che permetteva all'acqua di fluire dall'interno all'esterno della cellula prima di solidificare. I primi risultati però non furono soddisfacenti perché i cristalli di ghiaccio, crescendo, rischiavano comunque di rovinare dall'esterno la struttura della membrana cellulare. Un notevole passo avanti fu fatto con l'utilizzo dei crioprotettori (sostanze che impediscono la formazione di cristalli di ghiaccio) a bassa concentrazione e nel 1983 fu annunciato il primo esito positivo di gravidanza seguita all'impianto di un embrione precoce congelato con la tecnica lenta in presenza di crioprotettori. Tale metodica non tardò ad essere universalmente adottata e, a motivo dei risultati soddisfacenti della sua applicazione, ha subito nel tempo ben poche modifiche. Ovviamente, tanto critico quanto il processo di congelamento – e, forse, ancor di più – è quello dello scongelamento e del ritorno alle temperature fisiologiche. La tecnica del congelamento lento prevede uno scongelamento altrettanto lento unito all'allontanamento dei crioprotettori.

Nel decennio che seguì fu sviluppata una nuova tecnica, alternativa al congelamento lento, che prese il nome di 'vitrificazione' perché conferiva all'acqua dei campioni biologici la consistenza altamente viscosa tipica dei vetri, scongiurando così alla radice il pericolo di formazione di cristalli di ghiaccio. La vitrificazione si ottiene utilizzando procedure che sono agli antipodi di quelle seguite nel congelamento lento e cioè raffreddamento ultra-rapido in presenza di alte concentrazioni di crioprotettori. Anche lo scongelamento viene fatto avvenire molto velocemente.



Ai suoi inizi, circa trenta anni fa, la metodica fu usata proprio in embriologia per la conservazione di embrioni di topo ma, contrariamente a quanto avvenuto per il congelamento lento, il protocollo di vitrificazione ha subito cambiamenti significativi nel tempo. Le prime modifiche hanno avuto lo scopo di ridurre la concentrazione dei crioprotettori, potenzialmente tossici per le cellule; altre, successive, sono state finalizzate a ridurre il volume del campione. Tutto ciò ha portato alla varietà dei protocolli descritti attualmente in letteratura e applicati, con vario successo, agli embrioni di molte specie di mammiferi, incluso l'uomo (Cryostraw, Cryoloop, Cryotop).

È interessante notare che embrioni a stadi diversi di sviluppo richiedono l'introduzione di opportune varianti nel processo di vitrificazione. Non è difficile far risalire tali diversità di approccio alla diversa ricchezza d'acqua delle cellule e delle strutture embrionali. È esemplare, al riguardo, il trattamento richiesto dalle blastocisti che sono particolarmente ricche d'acqua a motivo della loro struttura cava (blastocela) piena di liquido. Prima di procedere alla vitrificazione vera e propria, è necessario togliere via dal blastocela il liquido che lo riempie e ciò può essere fatto o con un classico intervento di estrazione meccanica con microsiringa o con un più moderno trattamento laser. I risultati descritti in letteratura sembrano promettenti: le percentuali di attecchimento sfiorano il 60%.

La prima gravidanza umana portata a termine felicemente dopo l'impianto di una blastocisti vitrificata è stata descritta nel 2001. Attualmente la vitrificazione è sempre più utilizzata nella crioconservazione di embrioni precoci e di blastocisti di molte specie di mammiferi, compreso l'uomo, e un numero crescente di centri specializzati in tecnologie riproduttive lo adotta per alcune sue caratteristiche positive come (a) la pratica inesistenza di embrioni danneggiati dal trattamento, (b) la percentuale di sopravvivenza degli embrioni trattati, vicina a quella degli embrioni non trattati, (c) le percentuali di attecchimento, di gravidanza e di nascite vive mediamente più alte di quelle del congelamento lento, (d) i costi notevolmente inferiori rispetto a quelli del congelamento lento.

Nonostante l'altissimo numero di pubblicazioni scientifiche sull'argomento, sono stranamente pochi gli studi che presentano un'adeguata ampiezza di indagine e/o le necessarie garanzie statistiche. È illuminante al riguardo lo studio condotto da Abdel Hafez e collaboratori nel 2010. Delle 2.700 pubblicazioni esaminate solo 6 mostravano le caratteristiche richieste di completezza, accuratezza ed elaborazione statistica e soltanto in 4 di esse venivano messi a confronto i risultati della vitrificazione con quelli del congelamento lento. Tutti e quattro gli studi concordavano nel rilevare la superiorità della vitrificazione per ciò che riguarda la

sopravvivenza degli embrioni mentre solo due la consideravano superiore per ciò che riguarda la percentuale di attecchimenti e di gravidanze.

È degno di nota – per le sue implicazioni in campo bioetico oltre che clinico – il fatto che gli studi sulla vitrificazione hanno condotto a risultati interessanti anche per la crioconservazione degli oociti umani. Diversi studi affermano la superiorità di questa tecnica rispetto al congelamento lento sia per l'alto tasso di sopravvivenza degli oociti sia per la loro capacità di essere fecondati e di dar origine ad embrioni che presentano un normale sviluppo in vitro. A livello cellulare, inoltre, gli oociti vitrificati mostrano una migliore integrità del fuso e un più alto grado di allineamento cromosomico se confrontati con quelli sottoposti a congelamento lento.

Come si sarà potuto arguire da quanto detto, i metodi di vitrificazione necessitano di ulteriori approfondimenti di tipo sistematico e di più ampie indagini statistiche prima di poter essere formalizzati in protocolli che possano essere seguiti con tranquillità. Non sono pochi, comunque, gli esperti del settore pronti a scommettere che ciò accadrà in breve.



### Letture consigliate

Abdel Afez FF *et al.* (2010) – *Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis* – *Reprod. Biomed. Online* **20**, 209-222.

Ana Cobo *et al.* (2012) - *Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles* - *Fertility and Sterility* **98**, N°5, 1138-1146.

Tetsunori Mukaida *et al.* (2012) – *Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts* – *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* **26**, 789-803.

Xing-ling Wang *et al.* (2012) – *Outcomes of day 3 embryo transfer with vitrification using Cryoleaf: a 3-year follow-up study* – *J. Assist. Reprod. Genet.* **29**, 883-889.

\* *Professore Ordinario di Citologia e Istologia  
Università di Perugia  
Presidente nazionale MEIC  
(Movimento Ecclesiale di Impegno Culturale)*