

# Criteria di selezione degli ovociti: lo studio del citoplasma e del fuso meiotico

*Dr. Francesco Bertocci*

## **Introduzione**

La corretta valutazione della qualità ovocitaria è uno degli aspetti cruciali per l'esito delle tecniche di fecondazione assistita. Ovociti immaturi o di scarsa qualità o non saranno fertilizzati in vitro oppure daranno origine ad embrioni con scarso potenziale d'impianto. Alla luce della nuova legislazione, introdotta recentemente, la valutazione della maturità nucleare e citoplasmatica degli ovociti destinati sia alla ivf tradizionale che alla icsi assumerà un ruolo chiave per il successo finale di ogni trattamento.

E' ormai noto che per ottenere una buona qualità delle cellule uovo è importante:

- Una corretta selezione clinico-endocrina preliminare delle pazienti che permetta di utilizzare protocolli di stimolazione personalizzati
- Un corretto monitoraggio ecografico ed ormonale
- Un timing preciso della somministrazione dell'hCG che induce la ripresa della meiosi e la maturazione morfologica-funzionale del citoplasma ovocitario.

Una normale maturazione e crescita dell'ovocita richiede un adeguato supporto dalla teca ovarica e dalle cellule della granulosa. Lo sviluppo del follicolo è influenzato da una serie di sostanze tra cui ormoni, Fsh ed estrogeni; altre fattori come EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor) e IGF (insulin growth factor) influenzano la crescita del follicolo legandosi ai recettori specifici di superficie delle cellule della granulosa. Le induzioni farmacologiche della stimolazione ovarica ottenute attraverso la somministrazione di clomifene citrato, FSH, GnRHa, hMG e l'utilizzo di protocolli variabili superano questo sistema portando allo sviluppo di una serie variabile, quantitativamente e qualitativamente, di follicoli che al momento del pick-up permette di ottenere ovociti asincroni nel loro processo di maturazione e sviluppo. Valutare e selezionare i complessi cumulo-ovocita in base alla loro maturità è di fondamentale importanza sia per ottimizzare i tempi dell'inseminazione sia per fornire al ginecologo informazioni preziose su ogni ciclo di stimolazione ovarica.

## **Cenni di Ovogenesi**

La prima fase della riproduzione sessuale è la gametogenesi, il processo che porta alla formazione di ovociti e spermatozoi, cellule aploidi altamente specializzate. In uno stadio precoce dello sviluppo embrionale le cellule germinali primordiali migrano verso le gonadi, dove dopo una serie di divisioni mitotiche, entrano in meiosi. Alla fine della meiosi si ha la riduzione del numero di cromosomi che porta la cellula dallo stadio diploide(2n) allo stadio aploide(n).

Il periodo della crescita dell'ovocita è generalmente abbastanza lungo ed è caratterizzato da un aumento sostanziale di dimensioni. L'ovocita, nonostante abbia raggiunto all'interno del follicolo antrale l'abilità a riprendere la divisione nucleare, mantiene comunque la condizione di arresto meiotico grazie all'influenza inibitoria che le cellule del comparto somatico operano. Nel liquido follicolare si accumulano molte sostanze con funzione regolatoria, in grado di inibire la cellula uovo direttamente diffondendo attraverso l'oolemma, o indirettamente raggiungendo l'ovocita attraverso comunicazioni giunzionali presenti tra le cellule della granulosa ed ovocita, rapporto che consente a metaboliti, segnali intracellulari e segnali elettrici di diffondere fra i due compartimenti. Questo ruolo di controllo viene sbloccato fisiologicamente dal picco pre-ovulatorio delle gonadotropine, stimolo endocrino che innesca nella cellula uovo il processo di maturazione ed avvia il follicolo verso l'evento ovulatorio.

La maturazione e l'ovulazione nei mammiferi sono sotto il controllo degli ormoni ipofisari (FSH e LH) e, successivamente, degli ormoni dell'ovaio estrogeni e progesterone. Ma l'ovocita non possiede sulla membrana citoplasmatica i recettori specifici per l'LH e l'FSH e quindi la loro azione è mediata dalle cellule somatiche.

Nella donna la fase di proliferazione mitotica degli ovogoni termina prima della nascita dopodiché si ha la prima divisione meiotica che genera gli ovociti primari.

Durante la prima profase meiotica l'ovocita è circondato dalle cellule del mesenchima ovarico che si differenzieranno nelle cellule follicolari primordiali, la loro maturazione avviene nella pubertà, quando il volume del follicolo passa da 20 a diverse centinaia di  $\mu\text{m}$ , mentre l'ovocita cresce da 10 a 100  $\mu\text{m}$ .

La crescita prevede diverse fasi :

1) la sintesi e la conservazione di diverse quantità di RNA, proteine e substrati metabolici, 2) la divisione mitotica delle cellule della granulosa che lo circondano, 3) la sintesi e secrezione della membrana vitellina, nei mammiferi chiamata zona pellucida, e che viene ad interporsi tra l'ovocita e le cellule accessorie.

Indipendentemente dal tipo di messaggero generato dentro l'ovocita, la meiosi può ripartire solo quando i complessi meccanismi necessari a dirigere l'ovocita sono operanti. Questa condizione, nota come competenza meiotica, viene raggiunta in due momenti successivi durante l'accrescimento; dapprima l'ovocita acquisisce la capacità a sostenere la rottura della vescicola germinale per raggiungere lo stadio di MI e solo successivamente diviene capace di completare la divisione meiotica.

Nella fase tardiva dell'ovogenesi la membrana nucleare si rompe e la meiosi viene riavviata fino alla metafase II con l'emissione del primo globulo polare. La maturazione comunque non si esaurisce con la ripresa della divisione nucleare, ma si associa contemporaneamente a profonde modificazioni del citoplasma, altrettanto importanti nel condizionare lo sviluppo dell'ovocita.

Un'ovocita maturo deve essere in grado di rispondere all'entrata dello spermatozoo innescando alcuni processi : bloccare la polispermia, promuovere il processo di attivazione ed infine decondensare il nucleo del gamete maschile.

### L'ovocita

Nei follicoli primari è voluminoso, rotondeggiante con il nucleo disposto al centro della cellula e provvisto di nucleolo. Il citoplasma è finemente granulare e al microscopio elettronico si nota la presenza di mitocondri perinucleari e di un apparato di Golgi localizzato ad un polo cellulare. Nei follicoli in via di accrescimento l'ovocita aumenta di volume soprattutto nella sua componente citoplasmatica, fino a raggiungere 200-250 $\mu\text{m}$  di diametro. Il citoplasma si presenta ricco di granulazioni in tutta la sua superficie eccetto che nelle zone periferiche. L'apparato Di Golgi ed i mitocondri si trovano alla periferia cellulare, mentre il nucleo raggiunge i 30-40 $\mu\text{m}$  di diametro, è eccentrico e possiede un fine reticolo cromatinico in cui spicca un grosso nucleolo. Nel follicolo maturo l'ovocita termina la prima divisione meiotica, si forma l'ovocita di II°ordine che è aploide ed emette il primo globulo polare. L'ovocita di II° ordine, fermo nella metafase della seconda divisione meiotica, al momento della deiscenza follicolare porterà a termine la maturazione con la formazione del secondo globulo polare solo dopo un' eventuale fecondazione.

### **Tecniche usate per la valutazione ovocitaria**

Diverse metodiche permettono di valutare direttamente la maturità nucleare dell'ovocita: dalla tecnica descritta dalla Veeck (spreading of the cumulus-corona complex) a vari gradi di rimozione

delle cellule somatiche. La tecnica descritta dalla Veeck prevede l'allargamento e la parziale adesione delle cellule del cumulo su una piastra petri in una piccola goccia di terreno o di liquido follicolare. Muovendo la piastra opportunamente o riducendo il volume del terreno si permette alla tensione superficiale di allargare il cumulo per ottenere una visione migliore dell' ooplasma, dello spazio perivitellino e delle cellule della corona (Veeck, 1988).

In questa fase delicata è fondamentale evitare variazioni della temperatura, pH e di osmolarità dovute all'evaporazione rapida del medium, processo evitabile in parte operando in sistemi di coltura sotto olio equilibrato. Le cellule della granulosa più scure e dense, nonché i grumi di sangue che sono spesso presenti, possono oscurare la visione del complesso cumulo-ovocita e dovrebbero quindi essere rimosse meccanicamente usando il margine angolato degli aghi di siringhe specifiche o aspirando il complesso dentro e fuori una pipetta pasteur in vetro tirata opportunamente alla fiamma di un bunsen. Occorre molta cura ed esperienza per non danneggiare irreparabilmente gli ovociti sia usando le pipette di dimensione corretta e perfettamente tagliate che evitando pressioni eccessive sulle cellule del cumulo. Per la ICSI occorre rimuovere tutte le cellule del cumulo e della corona esponendo brevemente il complesso cumulo-ovocita alla ialuronidasi e susseguentemente liberando l'ovocita dalle cellule somatiche utilizzando pipette con diametro decrescente (140-150 $\mu$ ). In seguito si possono facilmente valutare gli ovociti in base alla loro maturità nucleare e classificarli anche in base alla morfologia del citoplasma considerando la presenza di inclusioni o dimorfismi citoplasmatici per selezionare ed iniettare solamente quelli che garantiscono uno sviluppo migliore. In questa fase è assolutamente necessario manipolare gli ovociti in tempi rapidi onde evitare di esporli ad avverse condizioni ambientali che potrebbero condizionare negativamente sia la fertilizzazione che lo sviluppo successivo.

Studi non recenti, ma interessanti hanno messo in correlazione la capacità proliferativa delle cellule del cumulo e delle cellule della corona *in vitro* e le percentuali di gravidanza ottenute (Gregory et al. 1994). Mentre la proliferazione delle cellule non è correlata con la diagnosi di infertilità, il protocollo di stimolazione, l'età della paziente, la qualità ovocitaria, la percentuale di fertilizzazione e la qualità embrionaria, esiste invece una relazione diretta con la percentuale di gravidanze cliniche. Altri studi hanno evidenziato una correlazione tra produzione di progesterone del complesso cumulo-ovocita e il potenziale di sviluppo di pre-embrioni in un programma di IVF (Wiswedel et al., 1987).

### **Valutazione maturità ovocitaria**

La corretta valutazione della maturità ovocitaria al momento del pick-up è determinante per il processo di fertilizzazione e successivo sviluppo.

Errate valutazioni della qualità ovocitaria possono condurre a tempi di inseminazione non appropriati e risultare in fertilizzazioni mancate o anormali.

Gli ovociti che sono stati inseminati prematuramente prima cioè della fase di metafase II, non hanno ancora iniziato quei processi che conducono alla decondenzazione della cromatina nucleare dello spermatozoo impedendo di fatto la fertilizzazione.

Gli ovociti possono risultare fertilizzati in modo anormale, mostrando tre o più pronuclei quando sono inseminati pre o postmaturamente; negli ovociti immaturi questo può essere dovuto alla risposta inadeguata dei granuli corticali che di norma prevengono la polispermia, mentre negli ovociti post-maturi il rilascio dei granuli corticali potrebbe essere inibito e la zona pellucida funzionare incorrettamente.

La valutazione morfologica degli ovociti si effettua dopo la fine del pick-up con uno stereomicroscopio di buona risoluzione e dotato di piastra riscaldata per evitare oscillazioni della temperatura. Dagli innumerevoli protocolli di stimolazione farmacologica si ottengono ovociti di vario aspetto e maturità; l'esperienza ci suggerisce che ogni ovocita dovrebbe essere valutato e trattato individualmente per ottimizzare le possibilità di gravidanza della paziente.

Fino ad oggi non sono ancora state sviluppate metodiche biochimiche attendibili per fornire accurate e rapide informazioni riguardanti lo stadio di maturazione degli ovociti prelevati, quindi la diretta osservazione al microscopio rimane ancora il migliore strumento a disposizione degli embriologi.

Circa l'80% degli ovociti recuperati dal liquido follicolare sono di qualità soddisfacente e in metafase II, il 10% hanno già cominciato il processo di atresia e il restante 10% sono immaturi.

La corretta identificazione della maturità nucleare e la caratterizzazione citoplasmatica è resa difficile dalla presenza delle cellule del cumulo e della corona che sono adese alla zona pellucida.

Per la IVF tradizionale il complesso cumulo-ovocita viene sospeso in una piastra petri con circa 1 ml di terreno, questo accorgimento permette l'espansione del cumulo per una migliore visione del citoplasma, della zona pellucida e dello spazio perivitellino. Per la ICSI il cumulo e le cellule della corona sono di norma rimosse consentendo una visione perfetta dell'ovocita privo delle sue cellule accessorie.

Storicamente la maturità ovocitaria è stata valutata dall'aspetto del cumulo ooforo e delle cellule che circondano l'ovocita al momento della raccolta. Durante il periodo pre-ovulatorio la morfologia delle cellule del cumulo e della corona subisce modificazioni sostanziali; la dispersione delle cellule del cumulo (diminuzione della densità cellulare) è infatti causata dall'accumulo di acido ialuronico nella matrice cellulare e dalla scomparsa delle gap-junction tra le cellule del cumulo.

Gli ovociti che possiedono un cumulo abbondante ed espanso con le cellule della corona radiata disposte regolarmente attorno alla zona pellucida sono definiti maturi; la presenza invece di un cumulo non-espanso con strati densi di cellule della corona è un segno dello stato intermedio della maturità e, infine, il cumulo assente definisce gli ovociti come immaturi (Veeck, 1991). Tuttavia l'espansione del complesso cumulo-ovocita non è sempre correlata direttamente con la maturità ovocitaria, diversi studi hanno riportato un'asincronia tra la morfologia del cumulo e della corona e la maturità nucleare (Mahadevan et al., 1990; Hammitt et al., D., 1993; Greenblatt et al., 1995). E' ben noto del resto che l'espansione del cumulo è gradualmente dipendente dall'ormone FSH nei cicli naturali, mentre nei cicli indotti farmacologicamente l'aspetto del cumulo non è un indice sempre realistico.

L'avvento della tecnica ICSI ha permesso una determinazione più esatta del livello di progressione meiotica e quindi della maturità ovocitaria. L.Veeck (1991) ha stabilito uno score di qualità ovocitaria basato sul fatto che solamente gli ovociti in metafase II caratterizzati da vescicola germinale non visibile e primo globulo polare visibile, possono essere utilizzati per la microiniezione.

- PROFASE I: vescicola germinale visibile, assenza di globulo polare
- METAFASE I: assenza di vescicola germinale, assenza di globulo polare
- METAFASE II: assenza di vescicola germinale visibile, I globulo polare
- POST-MATURO: I globulo polare visibile, degenerazione del citoplasma, disomogeneo.

### Profase I

L'ovocita in profase I è di solito definito come immaturo; possiede un corredo cromosomico tetraploide, risultato della presenza di 46 cromosomi in doppia elica.

La vescicola germinale (GV), che persiste durante le prime fasi di crescita, comincia il suo processo di dispersione fino alla rottura (GVBD) e l'ovocita aumenta di volume.

La maggior parte degli ovociti in profase I, raccolti durante il prelievo ovocitario, sono stati stimolati a riprendere la meiosi e si trovano nella fase finale della profase della prima divisione meiotica. Il breakdown della GV può iniziare entro alcuni minuti o richiedere diverse ore negli ovociti raccolti per una fecondazione in vitro e sembra dipendere da quanto gli eventi maturativi siano progrediti entro il follicolo prima del prelievo.

La vescicola germinale, o nucleo dell'ovocita umano è di forma sferica contenente un singolo nucleolo egocentrico; di solito è localizzata centralmente e migra verso la periferia prima della rottura.

La dissoluzione della vescicola germinale è il segno della ripresa della meiosi. Al microscopio ottico l'ovocita in profase I è caratterizzato dalla presenza ben distinta della vescicola germinale e dal suo nucleolo, spesso di forma irregolare, quasi sempre il citoplasma mostra una granularità dispersa e più scura; il cumulo è compatto e, a volte, multistratificato. Gli ovociti in questa fase richiedono 24-36 ore per completare il processo maturativo (fig.1).

### Metafase I

L'ovocita in metafase I ha completato la profase della prima meiosi; la vescicola germinale si è dissolta ed è scomparsa. Durante questa fase si forma il fuso meiotico ed i cromosomi si separano e migrano verso i due poli. Più tardi, durante la telofase, i cromosomi si distribuiscono nell'ovocita e nel globulo polare.

Al microscopio ottico, l'ovocita in metafase I è caratterizzato dall'assenza della vescicola germinale e del primo globulo polare. L'emissione del primo globulo polare avverrà in tempi successivi, ed è importante osservare l'ovocita ad intervalli regolari per determinare il momento più opportuno per inseminare. Infatti se gli spermatozoi vengono messi in contatto con l'ovocita prima che la maturazione nucleare e citoplasmatica sia completa, può succedere che gli spermatozoi non si decondensino all'interno dell'ooplasma o che avvenga una fecondazione anomala. Poiché l'estrusione del primo globulo polare può avvenire in qualsiasi momento dopo il pick up occorre esaminare l'ovocita ad intervalli regolari per determinarne la maturità nucleare. L'inseminazione è effettuata dalle 2 alle 4 ore dopo l'emissione del globulo polare.

L'ooplasma è rotondo ed uniforme, di solito lievemente colorato e talvolta leggermente granulare, la corona radiata è lievemente espansa e la massa del cumulo può essere sia espansa che densa.

### Metafase II

L'ovocita in metafase II è anche definito come maturo. In questa fase i cromosomi si sono ben divisi e separati tra il globulo polare (23 cromosomi, 46 cromatidi) e l'ovocita a cui sono attaccati i microtuboli del fuso meiotico.

Per un breve tempo, dopo la sua formazione, il globulo polare rimane connesso all'ovocita tramite il fuso meiotico, formando un ponte citoplasmatico. Il citoplasma che compone il primo globulo polare evidenzia mitocondri densi ed elementi lisosomiali e contiene granuli corticali a causa dell'estrusione prima della fecondazione. Il secondo globulo polare differisce dal primo proprio per l'assenza dei granuli corticali. Il globulo polare di solito ha una forma ovale, con una dimensione di circa 15µm che contiene i 23 cromosomi emessi dopo la telofase della prima divisione meiotica.

I cromosomi all'interno del primo globulo polare possono rimanere ammassati insieme oppure seguire la seconda divisione meiotica nel citoplasma. Il primo globulo polare contiene i granuli corticali che saranno rilasciati successivamente alla penetrazione dello spermatozoo. Anche nell'ovocita sono presenti da uno a tre strati di granuli corticali distribuiti alla periferia (fig.2)

Al microscopio ottico il tipico ovocita in metafase II mostra:

- 1) un primo globulo polare estruso (spesso difficilmente osservabile direttamente)
- 2) un citoplasma rotondo, uniforme, lievemente colorato ed omogeneo nelle granulazioni
- 3) una corona radiata espansa
- 4) le cellule del cumulo sono espanse ed è visibile macroscopicamente dalla sua forma rotondeggiante e da un citoplasma con granularità omogenea di colore chiaro.

L'inseminazione di questo tipo di ovociti viene effettuata dalle 2 alle 4 ore dal prelievo, ritardi superiori alle 12 ore possono influire negativamente sulle percentuali di fertilizzazione e sul corretto sviluppo embrionario.

### Ovociti post-maturi ed atretici

Gli ovociti post-maturi presentano un aspetto del complesso cumulo-ovocita ammassato e scuro, di solito lo spazio perivitellino è ampio ed il globulo polare comincia a degenerarsi. Negli ovociti atretici lo spazio perivitellino è ancora maggiore, il citoplasma è scuro, granulare e la sua forma è spesso irregolare, poche cellule sono adese alla zona pellucida e probabilmente il cumulo è assente; il globulo polare può o no essere presente. Sarebbe opportuno evitare di inseminare questo tipo di ovociti in quanto anche in caso di fertilizzazione normale gli embrioni risultanti raramente si impiantano.

Nella tabella sono riportate le caratteristiche morfologiche sostanziali del complesso cumulo-ovocita riferite ad ogni stadio maturativo.

Maturational status of the oocyte

<b>Maturation stage</b>	<b>Cumulus</b>	<b>Corona</b>	<b>Germinal vesicle</b>	<b>Polar Body</b>	<b>Classification</b>
<b>Profase (meiosi I)</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>Immature(IM)</b>
<b>Metaphase I</b>	<b>E</b>	<b>V</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>Intermedie(IN T)</b>
<b>MetaphaseII (meiosi II)</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>Mature(M)</b>

*Note: C = condensed, E = expanded, V= variable, + = present,- = absent.(da Oocyte and pre-embryo Classification, Handbook of the Assisted Reproduction Laboratory).*

### **Sistemi di classificazione ovocitaria**

La maggior parte dei sistemi di classificazione dividono gli ovociti dai tre ai cinque stadi di maturazione ed includono classi di immaturi, intermedi e maturi o profase I, metafase I e metafase II rispettivamente. Inoltre gli ovociti in metafase II possono essere suddivisi per includere classi di ovociti post-maturi od atretici.

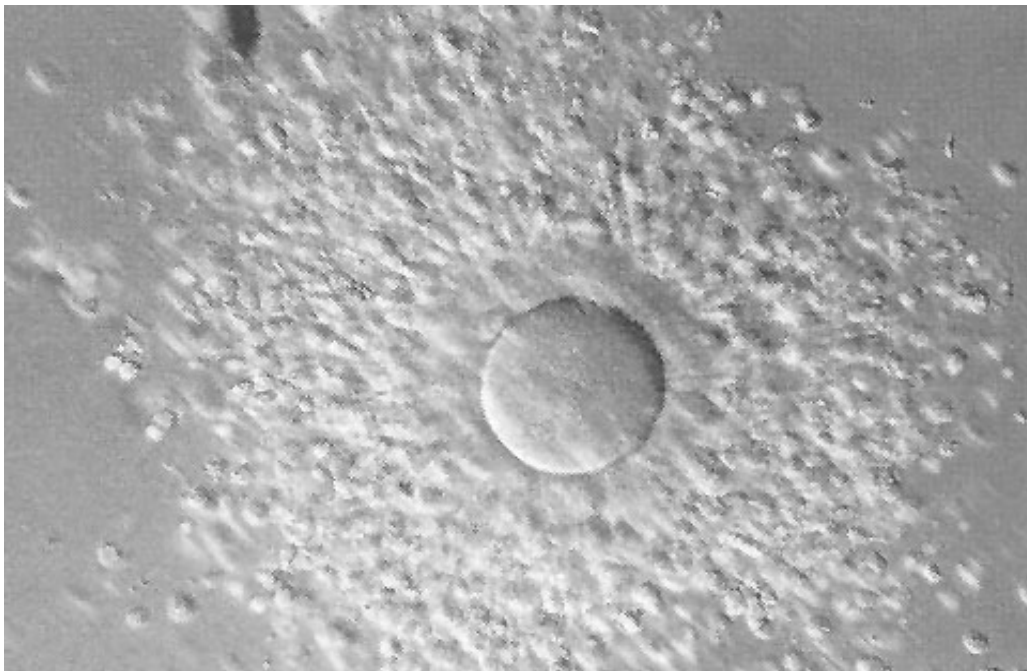
Altri sistemi classificano i complessi cumulo-ovocita assegnando un grado da 1 a 5:

- grado 1-immaturo
- grado 2-intermedio
- grado 3-maturo
- grado 4-post-maturo
- grado 5-atresico

Fig.1: Ovocita immaturo (profase I)



Fig.2: Ovocita maturo (metafase II).



Al momento del pick-up molti embriologi valutano sia la maturità nucleare dell'ovocita che la morfologia del complesso cumulo-ovocita usando una scala di gradi per la maturità nucleare e una per la morfologia (1-eccellente,2-buono,3-mediocre,4-scarso). Ad esempio quando un ovocita mostra un cumulo ed una corona espansi, un citoplasma chiaro ed omogeneo ed un globulo polare non frammentato potremmo attribuire uno score di 3-1 (maturo-eccellente). Questo sistema dovrebbe provvedere a fornire informazioni efficaci sul timing di inseminazione corretto, sulla qualità del protocollo di stimolazione utilizzato e quindi sul valore diagnostico e prognostico della qualità ovcitaria.

Bongso and Trounson (1999) hanno descritto un sistema per la classificazione ovocitaria che include lo stadio di vescicola germinale (grado 1), uno stadio per i metafase I (grado 2), due stadi per i metafase II (grado 3: maturo; grado 4: molto maturo), e uno stadio per gli ovociti postmaturi.

Anche per i casi programmati per la ICSI l'identificazione dei complessi cumulo-ovocita e la valutazione della loro maturità avviene durante o immediatamente dopo l'aspirazione follicolare, tuttavia se per la IVF tradizionale i complessi cumulo-ovociti sono inseminati quasi intatti nella ICSI le cellule del cumulo e della corona radiata sono rimosse enzimaticamente e meccanicamente prima della microiniezione.

Gli ovociti così decoronizzati possono essere facilmente classificati in base alla loro maturità nucleare, ma soprattutto possono essere selezionati e scelti per la microiniezione in base alla presenza di anomalie a livello del citoplasma e/o della zona pellucida.

### **Valutazione del Fuso Meiotico**

Allo stadio della seconda divisione meiotica (MII) i cromosomi dell'ovocita sono allineati all'equatore del fuso meiotico e questa struttura dinamica è formata da microtuboli localizzati alla periferia ovocitaria con un polo attaccato alla membrana plasmatica.

L'integrità del fuso meiotico è necessaria per garantire la correttezza della sequenza di eventi che completano la meiosi e la fertilizzazione. I microtuboli del fuso dell'ovocita tuttavia sono estremamente sensibili a modificazioni chimiche e fisiche che possono intervenire durante la loro manipolazione.

Anche i parametri fisiologici, come l'età materna avanzata e l'*ageing* in vitro dopo il prelievo possono danneggiare le fibre del fuso che possono condurre alla formazione di embrioni aneuploidi. Quindi l'integrità del fuso meiotico, che controlla i movimenti dei cromosomi durante la meiosi, è un fattore fondamentale per il successivo sviluppo embrionale.

Recentemente è stata messa a punto una tecnica che permette di visualizzare la posizione del fuso meiotico e quindi di evitare di danneggiare le fibre del fuso durante la microiniezione (ICSI).

Si tratta di un sistema di microscopia a luce polarizzata accoppiata ad un software di gestione di immagini che permette la visualizzazione del fuso meiotico (**Polscope**).

Alcuni lavori hanno dimostrato che la percentuale di ovociti che mostrano il fuso meiotico prima della ICSI varia tra il 60 e il 90% e questa differenza sembra essere associata a due fattori importanti:

- 1) Il controllo termico durante la manipolazione degli ovociti
- 2) La tecnica della visualizzazione del fuso meiotico

La rotazione degli ovociti sembra che permetta di visualizzare la posizione del fuso meiotico anche con poco contrasto e alcuni studi hanno dimostrato che con questa tecnica quasi il 90% degli ovociti mostra il fuso meiotico. Inoltre sembra che gli ovociti in cui il fuso non è visualizzabile abbiano scarso potenziale di sviluppo rispetto agli altri.

E' stata anche studiata la relazione tra posizione del fuso, localizzazione del primo globulo polare e risultati della ICSI, ma sembra che non ci siano differenze significative in termini di percentuale di fertilizzazione e qualità embrionale.

Il polscopio è stato utilizzato anche per valutare la presenza del fuso meiotico negli ovociti immaturi durante e dopo la loro maturazione in vitro.

Dato che l'utilizzo del Polscopio non interferisce in alcun modo con la vitalità ovocitaria l'analisi del fuso meiotico è un nuovo ed importante indicatore della qualità e maturità ovocitaria che può chiarire importanti aspetti della ICSI e fornire un parametro supplementare per la delicata scelta degli ovociti da utilizzare.

## **Altri metodi di valutazione degli ovociti**

Alcuni autori hanno valutato la concentrazione di alcuni ormoni e fattori di crescita contenuti nel liquido follicolare per stabilire un'eventuale correlazione con la maturità ovocitaria e la fertilizzazione.

Sebbene la concentrazione di alcuni parametri varia con i diversi stadi maturativi dell'ovocita, non è stata individuata alcuna differenza tra ovociti fertilizzati e non fertilizzati nel contenuto di estrogeni, progesterone, testosterone, prolattina, insulin-like growth factor, e ormoni di crescita (Artini et al., 1994).

Recentemente è stata valutata una possibile relazione tra la produzione intra-follicolare di leptina e la qualità degli ovociti raccolti e degli embrioni prodotti.

La leptina è un ormone con la funzione di segnale periferico dello stato nutrizionale della funzione riproduttiva e sembra che questo ormone sia direttamente coinvolto nella regolazione della crescita follicolare.

Valutando il livello di leptina contenuto nei follicoli ed il loro diametro rispetto alla qualità ovocitaria, alla fertilizzazione ed alla qualità embrionaria sembra che la produzione di questo ormone più che la dimensione dei follicoli dia qualche informazione predittiva sullo stadio maturativo dell'ovocita (Alvigi et al. abstract in progress, 2004).

## **Dismorfismo ovocitario ed ICSI**

La ICSI è ormai diventata una tecnica diffusa ed efficace nel trattamento dell'infertilità maschile (Palermo, 1992; Van Steirteghem, 1993a,1993b)

Il successo della tecnica ICSI è legato alla presenza di numerose variabili tra cui la qualità degli spermatozoi e degli ovociti. Sebbene sia stato riportato che la scarsa qualità degli spermatozoi sia correlata con ridotte potenzialità d'impianto degli embrioni risultanti (Kruger, 1986; Sun, 1984;) la ICSI è quasi sempre efficace nel superare quei difetti dei gameti maschili responsabili della mancata fertilizzazione (Silber,1994; Tucker,1995). Comunque la mancata fertilizzazione con la IVF tradizionale, può essere correlata a difetti ovocitari che impediscono la fertilizzazione anche utilizzando la tecnica ICSI.

La presenza di specifici fenotipi citoplasmatici dismorfici negli ovociti è stata associata a difetti intrinseci dei gameti femminili che potrebbero influire negativamente sulle potenzialità del successivo sviluppo embrionale (Van Blerklom et Henry, 1992; Xia,1997).

Dato che gli ovociti devono essere denudati dalle cellule follicolari prima della ICSI, è facile definire la presenza di difetti citoplasmatici di ogni singolo ovocita, e questo consente di stabilire una classificazione sulla base di criteri morfologici.

Le variazioni morfologiche osservate negli ovociti in metafase II includono differenze nella forma, nel colore, nella granularità e omogeneità del citoplasma, presenza o meno di inclusioni, di vacuoli, corpi refrattili ed irregolarità della zona pellucida. Ugualmente gli ovociti con un citoplasma apparentemente normale possono presentare alcune caratterizzazioni extracitoplasmatiche come un aumento dello spazio perivitellino, la presenza di detriti perivitellini, la frammentazione del primo globulo polare che potrebbero influire negativamente sullo sviluppo (Xia,1997; Hassan-Ali, 1998). Più recentemente (Ebner, 2000) è stata valutata la morfologia del primo globulo polare in relazione al tasso di fertilizzazione e alla qualità embrionaria (tab.2). I risultati emersi da questo studio ci suggeriscono che la morfologia del primo globulo polare dovrebbe essere considerata come criterio di selezione per la qualità ovocitaria. Gli ovociti di grado 3 e 4 hanno riportato tassi di fertilizzazione significativamente inferiori rispetto a quelli di grado 1 e 2. Inoltre gli ovociti di grado 4 hanno presentato anomalie multiple nel citoplasma che sono state associate con aumento delle frequenze di anomalie cromosomiche (Van Blerkom and Henry,1992).

Tab.2: Oocyte grading according to first polar body morphology

Grade	Shape of first polar body
1	Rotondo, ovale con superficie liscia
2	Rotondo, ovale con superficie rugosa
3	Frammentato
4	Largo e di forma anomala

Alcuni studi (De Sutter, 1996; Balaban, 1998) hanno messo in evidenza che la scarsa qualità morfologica ovocitaria non influisce negativamente sulla fertilizzazione né sulla qualità e sull'impianto dopo la ICSI, ma sembra che esista un aumento significativo delle percentuali di aborto prematuro in quelle pazienti che possedevano un'alta percentuale di ovociti dismorfici (Alikani, 1995). Inoltre l'autrice di questo studio non ha trovato differenze significative nei tassi di impianto e di gravidanza tra embrioni derivati da ovociti normali o dismorfici.

Infatti è stato riportato un tasso di gravidanze totale del 44.6% così suddiviso:

-20.8% da embrioni derivati da ovociti dismorfici

-45.9% da embrioni derivati da ovociti normali

-48.6 da embrioni derivati dalla combinazione di ovociti normali e dismorfici

Al contrario altri autori hanno osservato una diminuzione dei tassi di fertilizzazione e delle potenzialità di impianto di embrioni derivati da ovociti che presentavano inclusioni citoplasmatiche (Xia, 1997; Serhal, 1997).

Xia ha suggerito che quegli ovociti senza inclusioni, con globuli polari intatti e spazi perivitellini normali hanno miglior tasso di fertilizzazione e producono embrioni di migliore qualità.

Infine in uno studio recente Kahraman ha riportato un tasso di impianto del 4.2% con ovociti che presentavano una granularità densa e localizzata centralmente.

Sembra quindi, che le deviazioni della morfologia ovocitaria hanno poca o nessuna conseguenza sul tasso di fertilizzazione e di clivaggio dopo ICSI. Il superamento meccanico della zona pellucida e della membrana plasmatica può alterare in modo drammatico la dinamica dell'interazione tra i gameti umani.

Più specificatamente gli eventi responsabili della fertilizzazione come la decondensazione della testa dello spermatozoo e la formazione dei pronuclei sembrano essere influenzati dalla organizzazione ed integrità del citoplasma.

D'altra parte l'aumento degli aborti pre-maturi tra quelle pazienti che avevano ovociti "anormali" sembra accertato; è possibile che gli ovociti dismorfici possiedono un'alta incidenza di aneuploidia e queste osservazioni potrebbero trovare conferma eseguendo l'analisi cromosomica degli embrioni derivati da ovociti dismorfici.

Questi studi che suggeriscono ipotesi anche controverse, devono aiutare gli embriologi nel riconsiderare i criteri di selezione ovocitaria prima di effettuare la ICSI, al fine di migliorare le potenzialità di impianto degli embrioni da trasferire e quindi ottimizzare le possibilità di gravidanza delle pazienti.

## Bibliografia

Veeck, L.L. (1991) *Atlas of human Oocyte and Early Conceptus*.

Veeck, L.L. (1988) Oocyte assessment and biological performance, *Ann. NY Acad. Sci.*, 541, 259-74.

Gregory, L., Booth, A.D., Wells, C., and Walker, S.M. (1994) A study of the cumulus-corona cell complex in in vitro fertilization and embryo transfer; a prognostic indicator of the failure of implantation, *Hum. Reprod.*, 9, 1308-17.

Wiswedel, K. (1987) Granulosa cell metabolism and the assessment of oocytes quality in IVF, *Hum. Reprod.*, 2, 589-91.

Mahadevan, M.M. and Fleetham, J. (1990) Relationship of a human oocyte scoring system to oocyte maturity and fertilizing capacity, *Int. J. Fertil.*, 35, 240-244.

Hammit, D.G., Syrop, C.H., Van Voorhis, B.J., Walker, D.L., Miller, T. M., and Barud, K. M. (1993) Maturational asynchrony between oocyte cumulus-coronal morphology and nuclear maturity in gonadotropin-releasing hormone agonist stimulations, *Fertil. Steril.*, 59, 375-381.

Greenblatt, E. E. M., Meriano, J. S., and Camper, R.F. (1995) Type of stimulation protocol affects oocyte maturity, fertilization rate and cleavage after intracytoplasmic sperm injection, *Fertil. Steril.*, 64, 557-63.

Artini, P.G., Battaglia, C., D'Ambrogio, Barreca, A., Droghino, F., Volpe, A., and Genazzani, A.R. (1994) Relationship between oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors, *Hum. Reprod.*, 9, 902-6.

Bongso, A. et al. (1999) *Handbook of in vitro fertilization* 2<sup>o</sup> edition : 127-143.

Palermo, G. et al. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, 17-18.

Van Steirteghem, A.C. et al. (1993a) Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum. Reprod.*, 8, 1055-1060.

Van Steirteghem, A.C. et al. (1993b) High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 8, 1061-1066.

Kruger, T.F. et al. (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.*, 46, 1118-1123.

Sun, J.G., et al. (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 56, 602-607.

Silber, S.J., et al. (1994) Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum. Reprod.*, 9, 1705-1709.

Tucker, M.J., et al. (1995) Practical evolution and application of direct intracytoplasmic sperm injection for male factor and idiopathic fertilization failure infertilities. *Fertil. Steril.*, 63, 820-827.

Van Blerklom, J. and Henry, G. (1988) Cytogenetic analysis of living human oocytes: cellular basis and developmental consequences of perturbation of chromosomal organization and complement. *Hum. Reprod.*, 3, 777-790.

- Van Blerklom, J. and Henry, G. (1992) Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum. Reprod.*, 7, 379-390.
- Xia, P., et al. (1997) Correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum.Reprod.*, 12, 1750-1755.
- Hassan, Ali, H., et al. (1998) Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose. *Hum.Reprod.*, 15, 2390-2393.
- Ebner, et al. (2000) Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum.Repr.* 15, 427-430.
- Alikani, M., et al. (1995) Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote*, 3, 283-288.
- De Sutter, P., et al. (1996) Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* ,11, 595-597.
- Balaban, B., et al. (1998) Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* ,13, 3431-3433.
- Serthal, P. F., et al. (1997) Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 12,1267-1270.
- Kahraman S., et al. (200) Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 15, 2390-2393.