

*Non c'è nulla di male nel sostituire la professionalità con la razionalità*

## **A proposito di ovociti ed embrioni**

*una linea guida non troppo convenzionale per giovani embriologi (tanto gli anziani non ascolteranno)*

**Gábor Vajta, Valentina Casciani**

**2021**

## CONTENUTO

### TITOLO

*Non c'è nulla di male nel sostituire la professionalità con la razionalità*

### PREMESSA

#### 1. INTRODUZIONE

*Sta per iniziare una grande avventura*

#### 2. PRINCIPI

*Il ruolo dello scienziato è quello di infrangere le leggi della Natura*

#### 3. LA COSTRUZIONE

*Se vuoi che una cosa sia fatta bene, falla da solo*

#### 4. GLI INCUBATORI

*Per compensare l'assenza di gravità, gli americani hanno creato una biro pressurizzata*

#### 5. IL PRELIEVO

*L'efficienza complessiva viene ridotta dagli effetti cumulativi di una serie di passaggi apparentemente efficienti*

#### 6. METTERE INSIEME I PEZZI

*Il sesso è emozione in movimento*

#### 7. LA CULTURA

*Fare del proprio meglio non è più sufficiente. Ora dobbiamo fare ciò che sembra impossibile*

#### 8. FORTE!!

*Meglio un "ops!" che un "e se..."*

#### 9. ADD-ON

*Più un vicolo cieco è lungo, più assomiglia a una strada*

#### 10. ESPLORAZIONE E INNOVAZIONE

*Dovrei rifiutare la mia cena perché non capisco bene il processo di digestione?*

#### 11. PUBBLICARE

*Molti medici preferirebbero avere un calcolo renale piuttosto che presentare un lavoro*

#### 12. CORREGGERE E PREVENIRE

*Nel mondo esistono circa quattro milioni di tipi diversi di animali e piante. Quattro milioni di soluzioni diverse ai problemi di sopravvivenza*

#### 13. LA NOSTRA MISSIONE

*Alta tecnologia? Scordatelo. La FIV è una tecnologia bassa*

### EPILOGO – ultimo messaggio

## PREMESSA

Nonostante i migliori sforzi nei secoli, la medicina umana è tutt'ora una scienza e una pratica difensiva. Quando malattie degenerative, cardiovascolari, autoimmuni, maligne o infettive si manifestano, la medicina "difende" con l'obiettivo di eliminarle o almeno di controllarle. La prevenzione può essere efficace in alcune aree, ma la recente pandemia dimostra chiaramente la limitata disponibilità di risorse e la ridotta efficienza. D'altra parte, molti degli approcci preventivi sono anche difensivi.

La riproduzione assistita, soprattutto la parte condotta in laboratorio, ha un carattere diverso. Non vogliamo dire che sia "offensiva" (anche se lo è stata, e lo è ancora, per un numero sempre minore di persone in tutto il mondo). Diremmo piuttosto che è creativa.

Creativa, perché creiamo nuove vite. La parte più emozionante del nostro lavoro è ottenere la fecondazione e assistere allo sviluppo embrionale sin dalle prime fasi. Sostenere il processo il più a lungo possibile, coltivando in vitro gli embrioni preimpianto, fino a quando li salutiamo e li restituiamo alla Natura con una semplice iniezione nella cavità uterina.

Creativa anche perché è stata sviluppata in modo intuitivo, senza un'approfondita comprensione scientifica e un'attenta valutazione dei rischi. Retrospectivamente, è difficile comprendere l'audacia dei nostri pionieri che, nel 1978, hanno generato il primo essere umano attraverso la fecondazione in vitro (FIV) (Steptoe e Edwards, 1978), sulla base di successi fino a quel momento limitati a due sole specie (il coniglio, Chang, 1959; ed il topo, Whittingham, 1968). La prima bambina nata da FIV ha preceduto il successo della FIV nei bovini (Brackett et al., 1982), nei suini e negli ovini (Cheng et al., 1986), nei gatti (Goodrowe et al., 1988), nei cavalli (Palmer et al., 1991) e nei cani (nati solo nel 2015; Nagashima et al., 2015). Sulla base delle nostre, sebbene ancora limitate conoscenze attuali, la nascita di Louise Brown è stata un evento piuttosto fortunato. Sarebbe potuta accadere diversamente. È stata una delle rare situazioni in cui Madre Natura è stata dalla nostra parte.

Questo livello di coraggio non è né tipico né del tutto apprezzato nell'attuale embriologia umana. Le restrizioni legali sono oggi incomparabilmente più severe. Anche l'industrializzazione e la commercializzazione della FIV sembrano soffocare la creatività; i rigidi protocolli e le regole interne possono limitare ulteriormente il pensiero innovativo. Nonostante il detto "*Ordnung muß sein*" (l'ordine prima di tutto), una conseguenza negativa di questa nuova atmosfera è la diminuzione della produzione scientifica, la mancanza di progresso tecnologico ed il rallentamento, se non addirittura il declino, dell'efficienza complessiva. Occorre trovare una via d'uscita.

In questo periodo di riflessione, lo scopo di questo libro è quello di offrire un aiuto, sia sul piano teorico che su quello tecnico e intellettuale. Focalizzare l'attenzione sulle questioni più critiche, talvolta mettere in discussione i modelli standard, proporre alternative, stimolare la ricerca di soluzioni migliori e incoraggiare il pensiero creativo. Per ricordarci che, oltre alle questioni legali e disciplinari, non dobbiamo dimenticare i nostri doveri e responsabilità morali. In definitiva, trovare la soluzione ottimale nel contesto attuale.

Ci auguriamo che sia utile.

Non intendiamo competere con i numerosi manuali che trattano dettagliatamente l'embriologia di laboratorio, scritti e curati da gruppi di noti scienziati. I limiti di questo volume, così come la scarsa (o assente) conoscenza/interesse per alcune aree, ci hanno imposto di trattare solo alcuni argomenti, per colmare lacune, focalizzare l'attenzione su campi specifici o mettere in discussione alcuni punti di vista. Ci scusiamo se la vostra particolare area di interesse non è tra quelle qui trattate.

## 1. INTRODUZIONE

*Sta per iniziare una grande avventura  
Winnie the Pooh*

Anche se saremo in grado di sopravvivere ai cambiamenti climatici e ad altri devastanti eventi, si prevede che entro la fine del nostro secolo la popolazione mondiale sarà drasticamente ridotta. Ventitré Paesi sviluppati potrebbero perdere fino a metà della loro popolazione. Il motivo è il rapido declino del tasso di fertilità globale (da 4,5 nascite/donna nel 1950 a 2,4 nel 2017, e si prevede che scenderà sotto l'1,7 nel 2100).

(<https://www.bbc.com/news/health-53409521>)

(<https://www.focusonreproduction.eu/article/News-in-Reproduction-Population> ).

Nonostante l'ambiente possa trarre beneficio da questo cambiamento, lo squilibrio tra anziani e giovani potrebbe creare enormi tensioni sociali. Ogni possibile via per fermare o rallentare questa tendenza dovrebbe essere presa seriamente in considerazione.

L'infertilità colpisce, in tutto il mondo, dall'8 al 12% delle coppie, con picchi del 30% in alcune aree (Inhorn & Patrizio, 2015). Altre statistiche, meno precise ma più riconosciute, parlano del 15%. I risultati delle tecniche di riproduzione assistita dipendono da diversi fattori, tra cui la causa scatenante l'infertilità, l'età dei pazienti, l'indice di massa corporea (IMC), la posizione geografica e l'efficienza dell'unità di procreazione medicalmente assistita (PMA). Tuttavia, anche applicando le tecniche più efficaci, in media solo il 40-50% delle coppie infertili può essere preservato da un futuro senza figli.

Considerando i 130 milioni di bambini che nascono ogni anno in tutto il mondo, la PMA potrebbe contribuire con  $130 \times 0,15 \times 0,4 = 11,4$  milioni di bambini/anno e dunque potrebbe rappresentare uno dei maggiori contributi al rallentamento del futuro declino della popolazione. Al momento, tuttavia, il tasso di natalità annuale si aggira intorno ai 500.000 bambini/anno, meno del 5% delle possibilità teoriche e del bisogno (Fauser, 2019).

Quando parliamo di bisogni, le aspettative della società si riducono fondamentalmente ad un solo fattore, probabilmente non il principale. Come operatori sanitari, il nostro obiettivo primario è il benessere degli individui, o in questo caso della coppia, e la felicità dell'intera famiglia.

Esistono fondamentalmente tre modi per far avvicinare la realtà alle esigenze: uno quantitativo, cioè aumentare il numero e la capacità delle cliniche di fecondazione assistita; uno qualitativo, che miri a migliorare i nostri risultati, misurati comunemente in tassi di bambini nati vivi per trattamento; e un aspetto finanziario, che miri a rendere la fecondazione assistita di alta qualità accessibile alla più ampia popolazione, in tutte le aree geografiche. Noi embriologi di laboratorio abbiamo poche possibilità di contribuire alla prima ipotesi; tuttavia, il nostro ruolo può intervenire nella seconda e potremmo contribuire in modo considerevole anche alla terza.

Vediamo come ciò potrebbe accadere.

## 2. PRINCIPI

*"Il ruolo dello scienziato è quello di infrangere le leggi della Natura"*  
Steen Malte Willadsen

Nel campo della riproduzione assistita umana possiamo ritenerci fortunati. A differenza della maggior parte delle specie domestiche, se gli ovociti umani sopravvivono alle nostre manipolazioni e gli embrioni che ne derivano iniziano il loro sviluppo in vivo, la stragrande maggioranza di essi compenserà lo stress del periodo in vitro e diventerà prole sana. Nonostante i nostri interventi innaturali, gli effetti negativi a lungo termine (nati morti, anomalie dello sviluppo) sono incredibilmente bassi. La situazione "diviene sano o scompare senza tracce" ci preserva dalle forti conseguenze emotive, morali e legali dei nostri errori che derivano principalmente dalle limitate conoscenze, ma anche dall'errata scelta o applicazione di procedure consolidate. Dobbiamo però essere consapevoli che si tratta di un privilegio, una concessione e un'opportunità che potremmo non meritare e di cui non dobbiamo abusare.

Alla luce degli *special issues* pubblicati per celebrare i risultati di 40 anni della nostra professione e considerando le statistiche che parlano di 8 milioni di bambini nati, nessuno può sottovalutare il traguardo raggiunto. Nessuno lo fa. Anzi, a parte qualche voce discordante, tutti sembrano soddisfatti, sicuri ed ottimisti per il futuro. L'opinione generale è che stiamo facendo bene e che i progressi siano impressionanti.

Chiediamo, con rispetto: in confronto a cosa?

Stiamo parlando della stragrande maggioranza delle coppie infertili che sono rimaste tali in questi quarant'anni e tali rimarranno per sempre - come frutto di approcci carenti e del lento progresso nello sviluppo o nell'introduzione/acquisizione di nuovi approcci? Di mantenere costi estremamente elevati e in aumento a fronte di un effetto trascurabile, o persino negativo, sui risultati? Di mantenere un rigido sbarramento cosicché il trattamento dell'infertilità resti un privilegio delle persone ben informate, benestanti o fortunate nella maggior parte delle società del mondo?

Non abbiamo tempo da perdere. Innanzitutto, dobbiamo riconsiderare alcuni vecchi principi.

### 1. La via naturale

Per decenni abbiamo cercato di migliorare i sistemi di coltura in vitro con l'obiettivo di ridurre e possibilmente eliminare le differenze esistenti tra embrioni generati in vivo ed in vitro (Bavister, 1995; Mortimer et al., 2018). Rimane tuttavia normale definire l'ambiente in vitro come "inappropriato", "stressante", "ovviamente inferiore", mentre "l'ovidotto e l'utero forniscono il miglior ambiente di coltura possibile".

I fatti però smentiscono l'indiscussa superiorità della via naturale. La sola esistenza della nostra disciplina in senso lato, la medicina umana, è la prova più convincente: essa trova interamente fondamento sui fallimenti della Natura. La riproduzione assistita nell'uomo è nata per correggere l'infertilità - un fallimento del processo naturale.

Anche in una gravidanza spontanea da cui nasce un bambino sano, l'ambiente ovidotto-utero può non essere del tutto favorevole allo sviluppo embrionale. Il liquido contenuto nell'ovidotto non è solo il prodotto delle cellule epiteliali. Oltre alla secrezione di liquido, attraverso lo strato epiteliale avviene il trasporto passivo e attivo di diversi fattori solubili. Queste sostanze derivano dall'organismo materno, riflettono il suo stato attuale e ne includono di tossiche (come l'alcol e la nicotina), che possono avere profonde conseguenze sul futuro del feto e della prole, compresi gravi danni ed effetti negativi a lungo termine (vedi ref. in: Vajta et al., 2010).

Mistificando la via naturale, si ignora che l'efficienza del processo in vivo non è necessariamente superiore a quella in vitro. Nell'uomo, secondo una recente analisi, il 40-60% degli embrioni concepiti in vivo può andare perso dopo la fecondazione (Jarvis, 2016). Nei bovini, la produzione di embrioni in vitro è circa 100 volte superiore al processo in vivo, se calcoliamo il tasso di sviluppo a partire dallo stadio di follicolo antrale o di spermatozoo fino alla blastocisti. Quest'ultima differenza nell'uomo potrebbe essere anche più elevata se si esegue l'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI).

Il generare embrioni di mammifero in vitro non deve essere considerato una copia imperfetta di ciò che avviene in vivo, ma un processo artificiale con le sue caratteristiche, i suoi limiti e le sue possibilità. Il riconoscimento degli ostacoli presenti non deve limitare la ricerca di prospettive future. L'uso di sistemi in vitro offre infinite possibilità di scelta, nell'ambito, ma soprattutto al di là, delle convenzionali condizioni di "mezzo, gas, temperatura, olio", per stabilire modalità e passaggi che sfruttino appieno tutto il potenziale di sviluppo dell'embrione. Dovremmo anzi riflettere sugli elementi che non fanno parte del processo naturale e addirittura considerare l'ambiente in vitro come privo degli effetti potenzialmente o certamente dannosi del corpo materno.

## **2. Cosa è/non è necessario**

Una parte dei problemi è legata all'approccio "autocratico" di imporre agli embrioni ciò che dovrebbero preferire; ciò è dovuto sia ad una non corretta interpretazione di ciò che avviene in vivo, sia poiché si applicano meccanicamente alla coltura in vitro le caratteristiche ritenute essenziali in vivo.

Ad esempio, l'esistenza di alcuni fattori o fenomeni comunemente riportati come caratteristici dell'ovidotto non è stata confermata in vivo in mammiferi gravidi, in particolare dell'uomo. Diverse sostanze riconosciute come costituenti fisiologici del liquido oviduttale possono essere dannose in vitro (basti pensare semplicemente allo ione potassio). Altre, non presenti nell'ovidotto, potrebbero non avere l'effetto dannoso ampiamente ipotizzato in vitro (ad esempio, l'EDTA). Alcuni fattori attorno e persino all'interno degli embrioni potrebbero non essere necessari in un determinato sistema in vitro (ad esempio, l'acido ialuronico e le gocce lipidiche). Qualsiasi intervento basato su analoghi in vivo può avere effetti negativi che controbilanciano i benefici in vitro.

Una manifestazione più estrema di questo approccio è il presunto effetto positivo del flusso continuo di gas negli incubatori tradizionali. Al contrario, un volume di gas di 30 ml, statico per sette giorni consecutivi, durante la coltura di 200 embrioni bovini è più che sufficiente affinché il 50% degli ovociti sviluppino fino allo stadio di blastocisti. Simili false ipotesi hanno portato ai frequenti cambi di terreno durante la coltura embrionale al fine di evitare l'accumulo di sostanze tossiche e di minimizzare l'effetto dannoso degli embrioni degenerati, mentre questi effetti non sono mai stati effettivamente dimostrati.

L'unico modo possibile per evitare questi errori è trascorrere meno tempo alla scrivania e più tempo in laboratorio. Lasciate che siano gli embrioni - e non l'intelligenza artificiale - a dirvi di cosa hanno bisogno. Osservateli, aiutateli, amateli.

## **3. I fattori**

"C'è solo una cosa veramente importante in un laboratorio di FIV: tutto!" così afferma il recente Consensus Group del Cairo 2018 (Mortimer et al., 2018), elencando successivamente molti dei fattori - con molte ridondanze - ma dimenticando alcuni aspetti assolutamente fondamentali tra cui la temperatura ambiente del laboratorio. Parlare di "tutto" è scontato; questi luoghi comuni non sono in alcun modo utili per il lavoro pratico. È necessario stabilire una specie di graduatoria, dando priorità a fattori vitali spesso trascurati, per evitare gli errori più comuni.

I principali fattori su cui dovremmo concentrarci sono:

- la temperatura

- il tempo
- il pH e l'osmolalità
- l'eliminazione delle fonti di infezione e di danno tossico (compresa l'alta concentrazione di ossigeno)
- il microambiente
- le componenti essenziali dei terreni di coltura
- e la consistenza in tutti questi aspetti.

Nei capitoli successivi tratteremo tutti questi aspetti singolarmente. Aniché ripetere regole e soluzioni ovvie applicate su larga scala, ci concentreremo su metodi e idee più o meno non convenzionali, creati o consolidati nei nostri laboratori.

#### **4. Competenze e compiti**

Un recente manuale che tratta le principali competenze degli embriologi cita la riservatezza, l'aggiornamento dei registri, la tracciabilità, la sterilità, i microscopi, le questioni pratiche relative alla manipolazione di gameti ed embrioni e la riduzione dei rischi quali il mix-up.

Non mettiamo in dubbio l'importanza di questi punti. Tuttavia, potrebbe sfuggire una questione più importante: l'approccio. La FIV umana è una procedura medica. Gli embriologi lavorano con esseri umani vivi<sup>1</sup> e sono pienamente responsabili di una delle fasi più critiche e delicate della loro vita. Il laboratorio embrionale non è un "servizio" e gli embriologi sono sovrani e partner paritari dei medici.

La principale differenza tra un embriologo e un impiegato è la mentalità. Per comprendere (e far comprendere a tutti) il valore, il privilegio e la responsabilità di questa professione/vocazione, sarebbe necessario una sorta di giuramento di Ippocrate.

---

<sup>1</sup> Non vogliamo entrare in alcun dibattito morale o legale. I termini "esseri umani", "bambini", ecc. sono usati in questo testo di proposito per generare emozioni e approcci positivi, come l'empatia, l'amore, la cura e la responsabilità.

### 3. LA COSTRUZIONE

*Se vuoi che una cosa sia fatta bene, falla da solo*  
Napoleone Bonaparte

Un buon inizio è il segreto del successo. A questo proposito, non siamo molto fortunati. L'approccio didattico tradizionale ci impone di iniziare con la creazione di un'unità di fecondazione assistita, a partire dalla sua costruzione con tutte le questioni ad essa correlate.

Nonostante il modesto reddito di un embriologo renda spesso necessaria la sua diretta partecipazione ad attività edilizie private, non possiamo dichiararci progettisti o costruttori qualificati, esperti di materiali da costruzione o di arredamento. Per di più, i laboratori di fecondazione assistita richiedono standard specifici, la cui descrizione dettagliata è presente in quasi tutti i manuali di embriologia, con molti suggerimenti pratici. Non resta che fotocopiare queste pagine, passarle nelle mani di un imprenditore non del tutto estraneo a questioni di edilizia sanitaria e attendere la chiave della porta d'ingresso.

Ebbene, dopo aver visitato centinaia di laboratori di fecondazione assistita in tutto il mondo, abbiamo l'impressione che questo approccio venga utilizzato nella stragrande maggioranza dei casi. Il risultato è piuttosto deludente, salvo eccezioni. Siamo consapevoli che circostanze predeterminate e requisiti pratici a volte contraddittori non permettano di creare un perfetto laboratorio di embriologia umana, ma è comunque un obiettivo a cui dovremmo aspirare.

#### **La posizione**

Sappiamo che per mantenere una clinica ragionevolmente occupata e redditizia è necessaria una popolazione considerevole, tra 200.000 e 1.000.000 di persone a breve distanza. Vi è inoltre la necessità - e nella maggior parte dei Paesi l'obbligo di legge - di avere infrastrutture che rispondano a requisiti di legge aggiornati, di servizi di emergenza e sanitari e di personale qualificato. Edifici universitari, cliniche e grattacieli possono dare una sorta di percezione di grande professionalità e sicurezza.

Tuttavia, questi privilegi possono essere vanificati dagli svantaggi causati da un ambiente rumoroso, da un'aria maleodorante e di scarsa qualità e da un'atmosfera stressante; vi può essere un elevato numero di fattori imprevedibili e potenzialmente dannosi, tra cui l'eccesso di sostanze chimiche di varia natura provenienti dalle strade o da strutture situate in zone limitrofe oppure da attività di vario tipo svolte nelle vicinanze. Un'eccessiva densità di persone nei dintorni viene raramente menzionata, ma anch'essa può causare un forte stress chimico e psicologico. Per compensare tali effetti negativi, le unità di fecondazione assistita vengono implementate con innumerevoli strumenti e procedure di misurazione il cui effetto protettivo però è solo parziale; anzi questi, a loro volta, possono creare ulteriori problemi. Basti pensare alle vibrazioni e all'evaporazione causate dalle macchine di filtraggio e condizionamento dell'aria, per non parlare dell'effetto deleterio sul lavoro degli embriologi causato dai flussi d'aria delle cappe a flusso laminare.

Potendo scegliere, suggeriamo di preferire una struttura indipendente, in una zona tranquilla e indisturbata. È molto più facile gestire e servire un'unità simile secondo le esigenze specifiche della FIV umana piuttosto che lottare costantemente con le varie regole, restrizioni e complessità di una megastruttura.

*Permettetemi di citare un'esperienza personale. Per coincidenze estremamente fortunate, ho avuto il privilegio di lavorare in un laboratorio di embriologia nello Jylland, la parte continentale meno urbanizzata della Danimarca. Nel mezzo del nulla, a chilometri di distanza da qualsiasi area abitata. L'unica fonte di inquinamento atmosferico erano le piccole automobili dei ricercatori (ma molti di loro si spostavano in bicicletta, anche con la pioggia torrenziale o le rare tempeste di neve). Non avevamo aria condizionata, né pressione positiva, né filtri speciali per l'aria; facevamo tutto il lavoro sugli embrioni fuori dalle cappe, senza*

*guanti, e usavamo pipette a bocca (quindi le mascherine erano fuori questione). Non abbiamo mai avuto problemi con le vibrazioni anche se i micromanipolatori poggiavano su semplici tavoli di legno. Eravamo da sette a dieci persone, con poche oscillazioni, che lavoravano tranquillamente in armonia (rispetto agli standard internazionali, impressionante), senza visitatori per settimane, senza eventi speciali per mesi.*

*Utilizzando correttamente le regole di base del lavoro in sterilità, siamo riusciti a ottenere una media costante del 50% di blastocisti, nei bovini mediante fecondazione in vitro per ovocita prelevato e, nei bovini e nei suini, persino mediante l'attivazione partenogenetica e il trasferimento nucleare di cellule somatiche (media calcolata su oltre un milione di ovociti in 12 anni). Questi risultati sono stati, e sono tuttora, tra i migliori risultati mai pubblicati. Abbiamo avuto alcune contaminazioni (forse sei in totale), ma la fonte era solitamente del materiale biologico infetto; sono sempre state rapidamente identificate ed eliminate e mai collegate a qualche misterioso inquinamento atmosferico.*

Potreste dire “beh, si trattava di bestiame!”. Però, quando abbiamo avuto l'opportunità di fare un confronto, ci siamo resi conto che gli ovociti e gli embrioni umani sono meno sensibili alla maggior parte degli effetti ambientali rispetto alle loro controparti bovine o (soprattutto) suine. Inoltre, bisogna considerare che gli embrioni bovini hanno bisogno di più tempo, sette giorni di coltura in vitro, per raggiungere lo stadio idoneo al transfer.

Era solo un esempio; non stiamo suggerendo di trasferire il vostro laboratorio di PMA nel deserto del Gobi o in Antartide. Vogliamo solo ricordare che molti degli effetti nocivi da cui cerchiamo disperatamente di difendere i nostri embrioni li abbiamo creati noi stessi e possiamo evitarli con alcune precauzioni.

## **Planimetria**

Una disposizione ottimale è un privilegio raro e, con poche eccezioni, è possibile solo in un edificio di nuova costruzione o interamente ristrutturato.

Le priorità includono:

- locali per la manipolazione degli ovociti, del seme e degli embrioni, per l'incubazione e lo stoccaggio di tutti i prodotti chimici e materiali monouso e per il blocco operatorio che deve essere preservato dall'accesso ad estranei, preferibilmente da doppie porte;
- è necessario un collegamento diretto tra
  - il laboratorio e la sala operatoria (mediante *pass box*, porta o entrambi, a seconda dell'organizzazione della routine della clinica);
  - tra il laboratorio e i locali di stoccaggio/sala criogenica;
  - tra il laboratorio e il locale per la raccolta del seme; e, ovviamente,
  - tra la sala operatoria e le sale pre- e post-operatoria;
- è fortemente consigliato un ingresso separato per il materiale sporco, comprese le bombole di gas, le taniche di riserva dell'azoto liquido e il gruppo di continuità (UPS), ed una seconda porta che colleghi quest'area semi-esterna (ma ovviamente chiusa in modo sicuro) ai locali di stoccaggio/sala criogenica. Tutti i percorsi di trasporto e i siti di stoccaggio dell'azoto liquido necessitano di una pavimentazione idonea ad evitare i danni causati dalla caduta di azoto liquido;
- i locali per le visite e gli uffici/amministrazione/reception devono essere vicini fra loro e separati dal blocco sala operatoria/laboratorio;
- infine, l'ingresso al locale per la raccolta del seme non deve essere esposto agli occhi curiosi dei pazienti in attesa.

Soddisfare tutti questi requisiti è difficile ma, in casi fortunati, è possibile. Abbiamo selezionato alcune soluzioni per le strutture dedicate all'uomo e agli animali domestici. Alcune di esse possono essere costruite a partire da moduli trasportabili di dimensioni standard (Fig. 1-5).



Fig. 1. Schema di un piccolo centro PMA. Superficie: circa 200 mq; capacità: da 200 a 400 cicli/anno. La disposizione consente la costruzione a partire da moduli standard. Progetto: G. Vajta

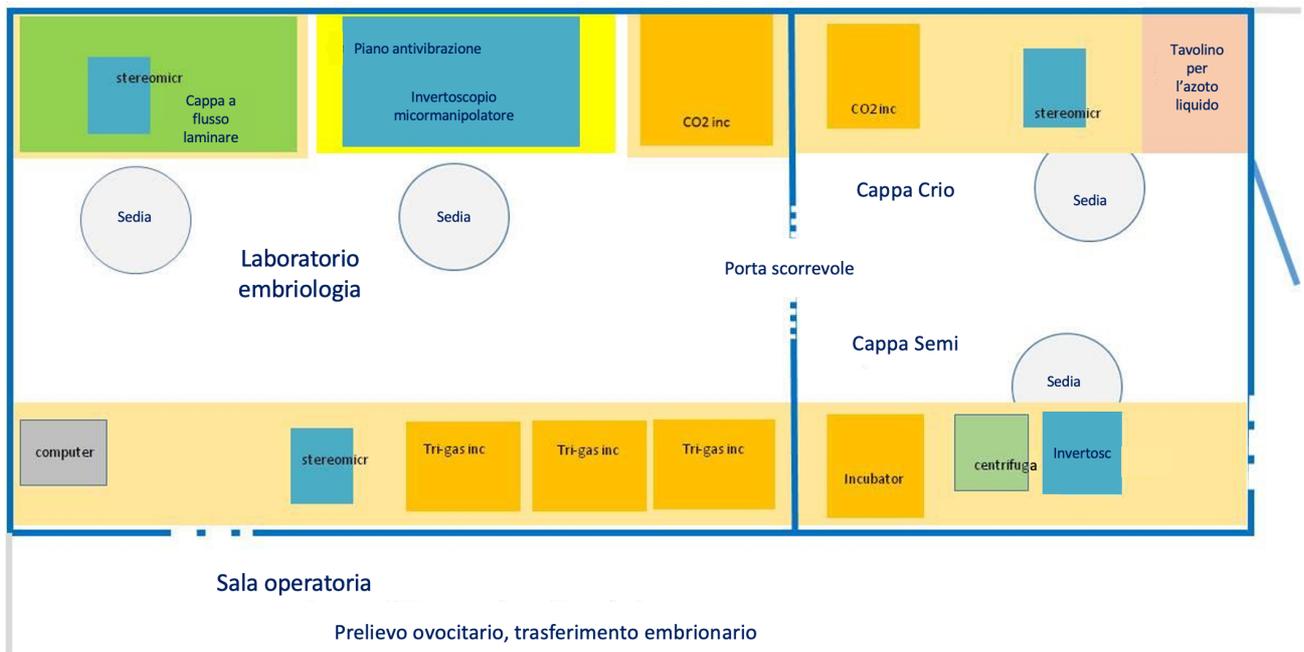


Fig. 2: Laboratorio di embriologia del piccolo centro di PMA illustrato sopra. Superficie: circa 25 mq. La disposizione consente la costruzione a partire da un container standard trasportabile. Progetto: G. Vajta

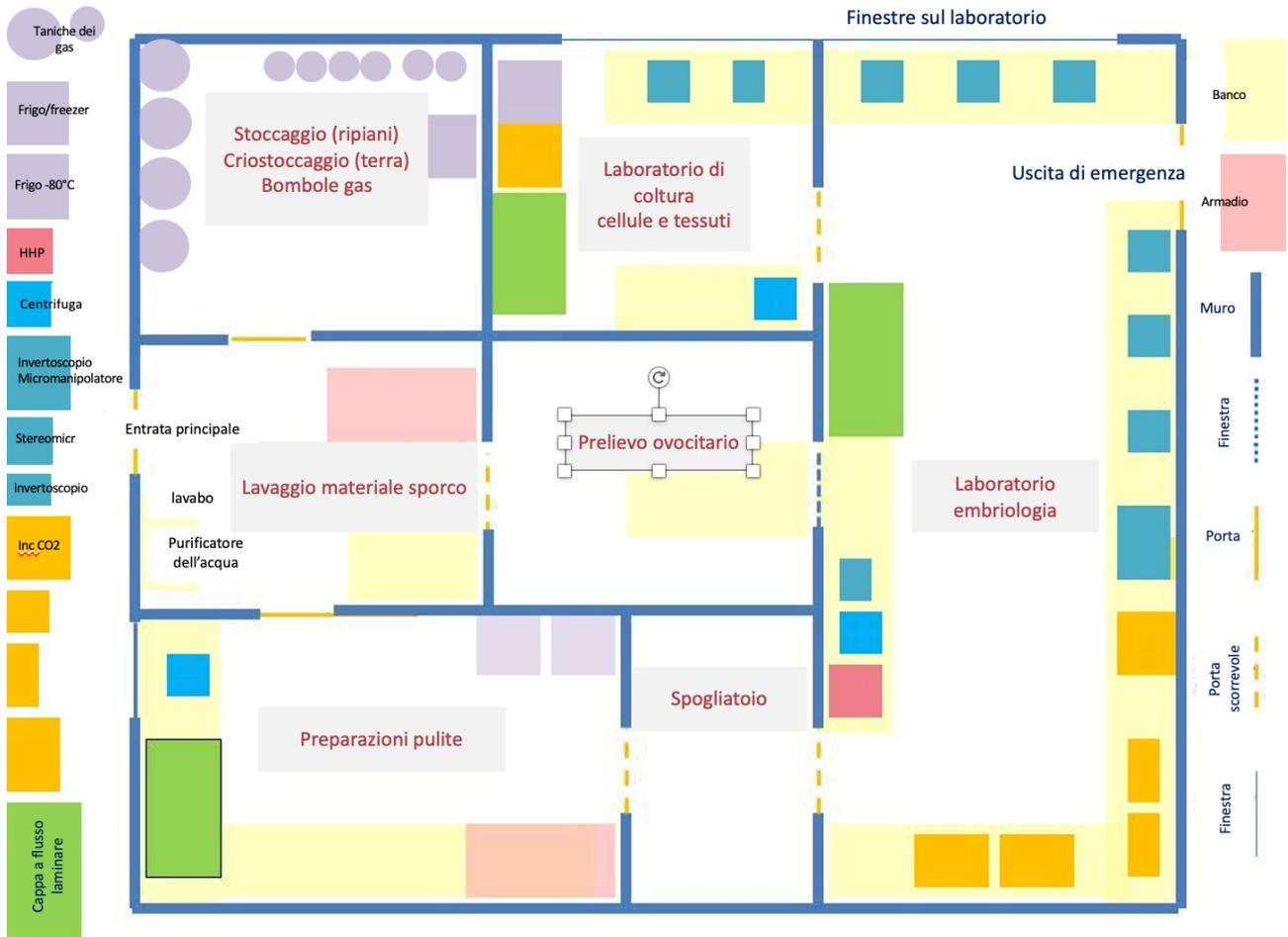


Fig. 3: Laboratorio di embriologia sui grandi animali da allevamento, per il prelievo di ovociti da ovaie di bestiame abbattuto, la maturazione in vitro, la fecondazione o il trasferimento nucleare di cellule somatiche, la coltura di embrioni in vitro e la crioconservazione. Superficie: circa 100 mq; capacità: da 4 a 6 ricercatori, da 3 a 4 tecnici per produrre fino a 100.000 ovociti maturati in vitro/anno. La struttura consente la costruzione a partire da moduli standard. Richiede alcune strutture di servizio separate.  
 Progetto: G. Vajta

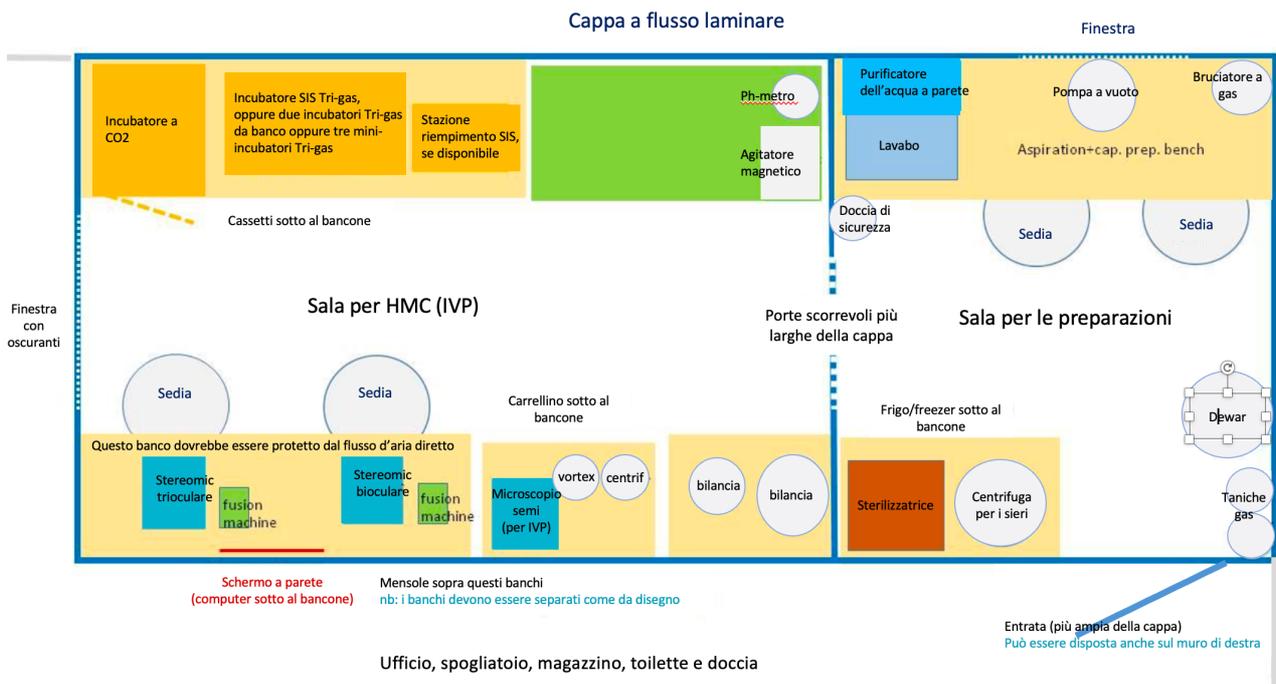


Fig. 4: Laboratorio di embriologia sui piccoli animali per gli scopi indicati sopra. Superficie: circa 25 mq. Capacità: da 2 a 3 ricercatori/tecnici per produrre circa 20.000 oociti maturati in vitro/anno. La disposizione consente di costruire da moduli standard. Richiede alcune strutture di servizio separate. Progetto: G. Vajta

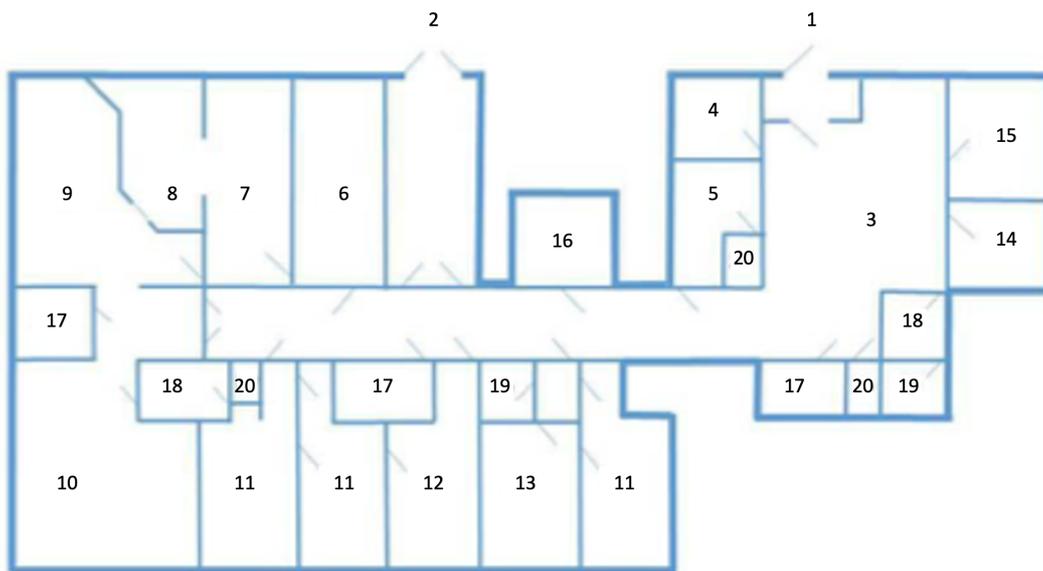


Fig. 5: Pianta di un'unità di PMA progettata in un'area preesistente nel seminterrato di un vecchio edificio universitario. Questa soluzione soddisfa quasi tutti i requisiti sopra elencati ed è un raro esempio di come sia possibile trovare soluzioni adeguate anche in situazioni complesse.

Legenda: 1. Ingresso principale, 2. Ingresso di servizio, 2. Accoglienza, 4. Sala prelievi, 5. Raccolta di seme, 6. Laboratorio esami ormonali e andrologico, 7. Laboratorio di crioconservazione e ICSI, 8. Laboratorio di embriologia, 9. Sala operatoria, 10. Locale post-operatorio, 11. Studi medici, 12. Sala riunioni, 13. Sala medici, 14. Archivio, 15. Cucina, 16. Sala criogenica, 17. Magazzino, 18. Spogliatoio, 19. Doccia, 20. Servizi igienici.

Progetto: Dr. Béla I. Bodnár e Zoltán Tándor. Con autorizzazione, per la quale esprimiamo la nostra sincera gratitudine.

## L'assemblaggio

Nella maggior parte dei manuali di riproduzione umana assistita sono disponibili ampie e utilissime descrizioni sui *materiali da costruzione, le vernici, i solventi, le colle, i pavimenti, i mobili, le tubature necessarie ai vari scopi, gli impianti di aerazione-condizionamento-filtrazione, l'impianto elettrico e l'illuminazione e altri requisiti legati sicurezza*. Il minimo errore in uno di questi aspetti può risultare un ordine di grandezza più costoso del prezzo, peraltro già molto elevato, di questi manuali. Gli ingegneri, i progettisti e i costruttori scelti dovrebbero essere a conoscenza delle normative locali, statali e nazionali, tuttavia, in alcuni casi, può essere utile chiedere un secondo parere ad evitare ritardi nelle procedure di autorizzazione/accreditamento.

In questo breve studio, citiamo solo alcuni aspetti pratici, quelli che ricevono meno attenzione da parte degli autori dei manuali, degli investitori e delle autorità, ma che possono aiutare a evitare complicità fastidiose.

Prima di tutto, parliamo di una questione fondamentale di sicurezza, spesso trascurata nelle unità di embriologia. I locali utilizzati per lo stoccaggio dei *dewar di azoto liquido* (più di 50L di volume totale, quindi praticamente in ogni laboratorio di embrioni umani) devono sempre essere dotati di un impianto di ventilazione robusto e sicuro, oltre che di un sensore per i livelli di ossigeno (con display sia all'esterno che all'interno del locale di stoccaggio) dotato di un sistema di allarme. In caso di basso livello di ossigeno (inferiore al 18%), è indispensabile un respiratore ad aria compressa per accedere al locale, se dovesse essere necessario, anche per soccorrere una persona in pericolo all'interno. Uno o due dispositivi di soccorso di questo tipo posizionati vicino alla porta d'ingresso del locale, possono salvare la vita. La mancanza di tali precauzioni ha già causato un incidente mortale in un laboratorio europeo di embrioni di animali d'allevamento.

Sebbene non sia strettamente legato alla costruzione di edifici, è opportuno ricordare che l'azoto liquido non può essere trasportato in nessun caso in un veicolo chiuso, vale a dire che nessuna persona può viaggiare nello stesso abitacolo in cui viene trasportato l'azoto liquido.

Una regola ovvia è che i laboratori di embriologia debbano essere in leggera (da 0,2 a 0,4 cm d'acqua) *sovrappressione* per evitare che aria non filtrata entri dai locali comunicanti. Tuttavia, la stessa norma vale anche per le sale operatorie ed è severamente regolata. Se questo conflitto non viene ufficialmente risolto e le autorità non riconoscono le esigenze specifiche dei laboratori di PMA, la realizzazione di una priorità ovvia diventa difficile.

Dei *colori scelti per pareti, banconi e pavimenti* si parla raramente. Il nostro suggerimento è quello di lavorare su superfici neutre e monocromatiche. Trovare capillari di vetro su un piano con pattern moderni e colorati può diventare impegnativo e persino rischioso. Inoltre, è meglio che si notino le macchie di sporco sul pavimento piuttosto che si nascondano tra mosaici multicolori per vederne poi le conseguenze in termini di contaminazione nelle nostre culture.

Per quanto riguarda l'*illuminazione*, come riscontrato da molti embriologi, non abbiamo evidenziato effetti negativi sugli embrioni in presenza di una normale illuminazione a soffitto. Anche la luce naturale, leggermente attenuata e ovviamente non in condizioni di pieno sole, è ben tollerata. In generale preferiamo utilizzare una leggera illuminazione calda per la stanza e lampade da tavolo per i piani di lavoro. Questa disposizione crea la sensazione di una sorta di privacy ed è anche più pratica per alternare il lavoro al microscopio con quello macroscopico.

La *temperatura del laboratorio di embriologia* è un parametro fondamentale anche se, stranamente, piuttosto trascurato. Si usano comunemente espressioni come "temperatura ambiente", "temperatura ambientale" ma poi si lascia all'immaginazione e alla sensazione di ognuno cosa ciò voglia dire senza tenere conto del continente, delle stagioni, delle abitudini e percezioni di ognuno, della stabilità del sistema di

riscaldamento/condizionamento. Così, tali definizioni finiscono per includere qualsiasi temperatura compresa tra i 18 e i 26°C (esperienza personale in vari laboratori, in vari continenti).

In un laboratorio di embriologia ci sono molti fattori difficili da controllare. La temperatura ambiente non è uno di questi. Tuttavia, la mancanza di consapevolezza dell'importanza della temperatura durante lo sviluppo embrionale ha rallentato i progressi dell'embriologia per (almeno) 70 anni. La nostra impressione è che il problema esista ancora e crei molte incongruenze.

Siamo tutti d'accordo che gli embrioni preferiscano parametri costanti, come del resto accade nel corpo materno. Togliermoli dall'incubatore significa sottoporli a uno stress incontrollato. I piani riscaldati possono aiutarci a mantenere costante la temperatura, ma nell'aria fredda al di fuori dell'incubatore le fluttuazioni sono inevitabili e incontrollabili. Si deve tenere conto che molte procedure (digestione enzimatica, attivazione, equilibratura, diluizione) sono temperatura-dipendenti e i parametri sono stati ottimizzati per una data temperatura; pertanto, condizioni ambientali casuali aumentano l'imprevedibilità del risultato.

La temperatura di 25°C utilizzata per la vitrificazione di ovociti ed embrioni umani sembra essere un compromesso ragionevole tra la zona di tolleranza degli embriologi e quella degli embrioni. Non contribuisce ad aumentare il rischio di contaminazione e può diminuire significativamente lo stress per gli embrioni. Sembra quindi essere uno standard ragionevole per tutte le procedure di laboratorio da eseguire al di fuori degli incubatori e, nel nostro lavoro quotidiano, può eliminare una fonte significativa di inconsistenze.

Suggeriamo quindi vivamente di dotare il laboratorio di un sistema di riscaldamento/condizionamento altamente preciso ed affidabile e di collocare termometri digitali ben evidenti e leggibili sulle pareti più visibili di ogni locale in cui si lavora con gli embrioni.

## Strumenti

Per i *grandi e piccoli strumenti* ed apparecchiature, diamo un suggerimento generale. Proprio come nel caso degli elettrodomestici, non è consigliabile acquistare i modelli più economici a meno che non si abbiano effettive ragioni per farlo (e la mancanza di denaro non dovrebbe essere tra queste). Allo stesso tempo fate attenzione ad acquistare gli ultimi modelli pieni di funzioni extra, a meno che non vogliate partecipare al velato esperimento dei produttori che vogliono testare la macchina, il mercato e la misura delle vostre tasche. Un modello collaudato di 3-5 anni prima, con buone referenze, può rappresentare un investimento più sicuro e una funzionalità/utilizzabilità più affidabile.

Non risparmiate sul numero di piani riscaldati e piastre riscaldanti. Acquistatene più del necessario, ma non lasciatevi attrarre dalle funzioni speciali. Nel nostro laboratorio di clonazione, per decenni sono risultati perfetti dei tappetini riscaldanti acquistati in una farmacia locale, poi dotati di un piano di acciaio; abbiamo dovuto regolare la temperatura solo una volta al momento dell'installazione. Non suggeriamo la stessa soluzione per la PMA, ma sensori multipli, software e schermi che mostrano la distribuzione delle temperature sono un lusso inutile.

Comunque, assicuratevi che

- ogni singola *provetta* contenente terreno di coltura, olio compreso, sia mantenuta a 37°C (o alla temperatura interna della specie in questione). A questo scopo non sono necessari termoblock autoriscaldanti. È sufficiente acquistare o ordinare al fabbro dei semplici blocchi di alluminio (molti) con gli appositi fori cilindrici e posizzarli sulle piastre riscaldanti (Fig. 6a).
- tutte le *piastre* di terreno di coltura, o che già ospitano ovociti ed embrioni, vengano mantenute, per tutto il tempo in cui non sono utilizzate direttamente, sui piani riscaldati coperte da scatole di plastica semitrasparente: i coperchi delle scatole dei puntali sono perfetti per questo scopo.

Per quanto riguarda i timer, consigliamo vivamente quelli robusti da banco con tastiere semplici e logiche, che si possano avviare e fermare anche senza guardarli, come i timer Jadco (Fig. 6b). Questi possono essere avviati/arrestati con una sola mano e non hanno bisogno di ulteriori supporti. Un orologio colorato fissato alla divisa può essere carino, ma da troppa libertà di allontanarsi dal banco di lavoro. D'altra parte, se necessario, si può sempre mettere il Jadco in tasca. Un altro consiglio: non utilizzate diversi tipi/marche di timer in laboratorio. *Varietas delectat* (la varietà è piacevole), ma nel nostro caso può essere fonte di errori.



**Fig. 6:** a. Termoblock di alluminio per riscaldare le provette, b. Timer da banco Jadco

È infine opportuno mantenere il piano di lavoro in un ordine scrupoloso, soprattutto se più persone utilizzano la stessa postazione per una specifica procedura e, in generale, rimuovere tutto ciò che non è assolutamente necessario per il lavoro in questione. Quindi è consigliabile posizionare tutto ciò che è serve (microscopio, pipette, puntali, termoblock, coperchi di plastica, timer) esattamente nella stessa posizione per tutto il tempo. Le mani devono essere in grado di trovare tutto senza controllo visivo e senza pensare. Per un lavoro rapido ed efficiente è indispensabile un ordine di tipo militare.

Infine, per quanto riguarda gli *incubatori*. Un laboratorio di FIV ha sicuramente bisogno di più di un incubatore, tra cui

- uno o due grandi incubatori a CO<sub>2</sub> "da battaglia" per le incubazioni brevi e per le pre-incubazioni delle piastre di terreno con tampone bicarbonato;
- un incubatore semplice non gasato per il preriscaldamento dei terreni di coltura a base di HEPES o MOPS;
- infine, ma soprattutto, speciali incubatori tri-gas per la coltura di embrioni.

Quest'ultimo argomento merita un capitolo a parte.

## 4. GLI INCUBATORI

*Per compensare l'assenza di gravità nello spazio, gli americani hanno creato  
- per diversi milioni di dollari - una biro pressurizzata.  
I russi invece usavano le matite.*

Forse non è vero, ma è tipico. E, per quanto riguarda l'embriologia, non dovremmo incolpare gli americani. Più precisamente, non solo loro.

In Ungheria esiste un'espressione "*Állatorvosi ló*", che letteralmente si traduce in "Il cavallo del veterinario". Ha avuto origine nel 19° secolo, quando uscì un'illustrazione che mostrava un cavallo con tutte le possibili malattie esterne e interne che può avere. Oggi si usa per descrivere tutte le condizioni (negative) attribuibili a qualcosa. Non esiste un'espressione simile in inglese - quindi, permettetemi di suggerire "*The embryology incubator*" ("L'incubatore di embriologia") come sinonimo autentico e plausibile.

Sarebbe potuto accadere diversamente. Negli anni Novanta, la creatività in embriologia non era un privilegio delle grandi multinazionali. Al contrario, caratteristiche indispensabili nei laboratori e degli scienziati di successo erano la capacità di risolvere problemi pratici e l'abilità manuale, poiché l'industria era piuttosto noncurante nel contribuire in una disciplina così marginale e controversa.

Nell'ultimo decennio dello scorso millennio, la rapida crescita del numero di embrioni nei laboratori umani e di animali ha creato una nuova sfida. I grandi incubatori tradizionali "a scatola" (*box incubators*), utilizzati con successo per le colture di cellule e tessuti, non erano in grado di fornire l'accuratezza e la stabilità necessarie per ospitare piastre di più trattamenti, con diversi tempi di apertura delle porte ad inizio e fine ciclo e durante i vari checkpoint.

Se il laboratorio disponeva di un solo incubatore a CO<sub>2</sub> per tutte le pre-incubazioni e le manipolazioni nelle fasi di maturazione, fecondazione e coltura embrionale (una situazione piuttosto tipica a quei tempi), la porta dell'incubatore veniva aperta fino a 15 o addirittura 25 volte al giorno. Alla fine, l'intero sistema collassava e lo sviluppo delle blastocisti scendeva dal 25-30% a zero. I direttori, confusi, richiedevano l'interruzione di tutti gli esperimenti e tutti dovevano contribuire alla pulizia e alla ventilazione e alla preparazione di nuovi terreni di coltura.

Un riavvio lento delle attività, con uno o due cicli, aveva (di solito) molto successo. Il sollievo era tangibile e concreto e, di settimana in settimana, veniva avviato un numero crescente di esperimenti; fino al successivo inevitabile collasso. A quei tempi, lo scambio di informazioni era lento e molto meno efficiente di oggi, per cui la maggior parte dei laboratori doveva imparare a proprie spese le ragioni - a posteriori ovvie - di questa ciclicità: la fluttuazione continua ed estrema dei parametri critici per il corretto sviluppo embrionale.

### I primi progetti

Alla fine, è stata trovata ed utilizzata in molti laboratori una semplice soluzione casalinga. *I grandi e spessi contenitori di vetro degli essiccatori*, destinati normalmente alla conservazione di sostanze chimiche, sono stati utilizzati diversamente: al loro interno venivano inserite le piastre di ciascun programma sperimentale; i contenitori venivano poi riempiti con una miscela di gas appropriata e a loro volta riposti in un grande incubatore. Sebbene il ripristino della temperatura richiedesse diverse ore, il successivo periodo con parametri costanti portava a risultati migliori e più consistenti. L'unico problema erano le dimensioni: i contenitori erano grandi e un incubatore poteva ospitarne solo uno o forse due.

A quei tempi, la Danimarca era La Mecca europea della ricerca in embriologia sugli animali d'allevamento, quindi non è sorprendente che il primo incubatore per embrioni progettato *ad hoc* fosse stato introdotto a Copenaghen in collaborazione con una piccola ed emergente azienda locale, oggi nota come K-system

(Avery e Greve, 1992). Una piccola cassetta metallica dotata di una camicia d'acqua collegata tramite una pompa ad un bagno esterno riscaldante: tutto qui. Il gas premiscelato veniva introdotto nell'incubatore attraverso un piccolo foro e rilasciato sul lato opposto attraverso un altro piccolo foro. Dopo alcuni minuti di flusso di gas in entrata e in uscita, i due fori venivano chiusi con del nastro isolante e l'incubatore veniva quindi lasciato indisturbato per 5-7 giorni, a seconda della specie di cui si volevano coltivare gli embrioni. Il sistema era semplice, consistente ed affidabile, e permetteva di produrre embrioni di ottima qualità. Con alcuni miglioramenti pratici, sarebbe potuto diventare un'apparecchiatura estremamente utile nei laboratori di embriologia umana e animale di tutto il mondo. Sfortunatamente, il suo uso è stato limitato ad alcuni laboratori animali danesi e nel giro di un decennio è stato completamente dimenticato.

### Interessi industriali

Da questo punto in poi le cose sono andate avanti, purtroppo però non sempre nella giusta direzione. Nel primo anno del nuovo millennio, un'azienda presentò un progetto rivoluzionario, un incubatore da banco con apertura dall'alto (*toploader*). Per testare il prototipo fu scelto il nostro laboratorio di embrioni bovini (oltre ad altri laboratori). Utilizzavamo colture singole ininterrotte dal giorno 1 (o dal giorno 0 per la clonazione) al giorno 7. I risultati del nuovo modello furono soddisfacenti, ma non così buoni come quelli ottenuti con i nostri sistemi di incubazione classici (o alternativi, si veda più avanti). Nemmeno l'aspetto delle blastocisti ci convinceva del tutto.

La nostra opinione fu ritenuta irrilevante; l'incubatore fu messo sul mercato e presto utilizzato in molti laboratori di PMA. Altre aziende iniziarono a produrre modelli simili modificando la semplice struttura iniziale con l'aggiunta di fantasiosi complementi. La fornitura esterna di gas premiscelato fu sostituita da un miscelatore incorporato, con la possibilità di regolare i parametri separatamente per ogni camera di incubazione e di impostare valori estremi che però erano assolutamente inutili in un laboratorio di PMA. Furono create, sempre per ogni singola camera, porte di uscita per l'analisi dei gas e, per la regolazione della temperatura, sofisticati sistemi che permettevano di impostare la temperatura per ogni camera offrendo un ampio range del tutto inutile nella pratica. Furono inserite porte digitali per trasmettere a bei display multicolore tutti i parametri, incluse le medie giornaliere (ovviamente con valore pratico nullo), per motivi di sicurezza, soprattutto quella del responsabile finanziario dell'azienda produttrice.

Tuttavia, alcune caratteristiche di questi incubatori *toploader* (compartimentazione, rapido ripristino dei parametri) furono indiscutibilmente vantaggiose e costrinsero i produttori di *incubatori tradizionali a scatola* ad adattarsi ai nuovi requisiti. Tra le innovazioni vantaggiose vi furono una maggior precisione dei sensori e, di conseguenza, dei parametri dell'atmosfera interna; camere semi-isolate con sistemi a doppia porta e miscelatori tri-gas integrati. Un altro passo in avanti fu la riduzione delle dimensioni delle camere, con lo scopo di ospitare in ciascuna di esse un numero inferiore di pazienti (idealmente solo uno). Sfortunatamente, le piccole dimensioni non equivalsero ad una proporzionale riduzione del prezzo e molte poche erano le cliniche che potevano permettersi un tale investimento, uno spazio sufficiente e costi di gestione più elevati per acquistare decine di incubatori di questo tipo. Inoltre, sebbene le dimensioni fossero ridotte rispetto a quelle degli incubatori più grandi e favorissero un più rapido ripristino dei parametri interni dopo l'apertura di una porta, questa capacità rimaneva di gran lunga inferiore a quella degli incubatori *toploader* da banco.

Lo sviluppo non si è fermato qui. Sono state fabbricate strutture ibride con complementi innovativi e la comparsa degli incubatori *time-lapse* ha procurato ulteriori opportunità nonché modi per investire in incubatori grandi somme di denaro dei pazienti. I dati sui benefici di queste nuove tecnologie sono pochi; per quanto riguarda il *time-lapse*, si tratta di una sorta di accessorio, al di là di un problema legato alle piastre di coltura, di cui parleremo più avanti.

Un aspetto è stato quasi del tutto trascurato, sia dai produttori che dagli embriologi: l'*umidità*. I produttori hanno avuto problemi con l'accuratezza dei sensori di umidità nell'atmosfera interna degli incubatori; è stato anche detto loro che, a differenza delle fiasche usate per le colture dei tessuti, le gocce ricoperte di

olio delle piastre per l'embriologia sono ben protette dall'evaporazione. Quindi, hanno semplicemente creato incubatori con umidità "ambientale" (dove "ambientale" resta un termine senza senso, analogo a "idiopatico" usato in medicina, su cui cade la nebbia accademica del *non-ne-ho-idea*), e orgogliosamente hanno pubblicizzato i vantaggi di questo nuovo approccio capace di limitare il problema delle infezioni fungine.

Gli esperti in colture di tessuti sanno bene che esistono metodi sicuri per ridurre al minimo il rischio delle contaminazioni legate all'umidità. Nei Materiali e Metodi di tutte le pubblicazioni antecedenti al 2005 si usa l'espressione standard "umidità massima". Non abbiamo nemmeno pensato di apportare modifiche. Il *troubleshooting* nei laboratori di embriologia è da sempre una tematica complessa, ma le infezioni fungine? Ricordiamo solo due eventi in 25 anni, e solo uno è stato collegato alla vaschetta d'acqua dell'incubatore.

In ogni caso, le infezioni fungine sono rare e facili da prevenire, e il nuovo approccio "a secco" per diminuirne il pericolo può essere giustificato solo se non provoca effetti negativi.

### **Uno, due, uno**

Per una sfortunata coincidenza, nel momento in cui in embriologia sono stati introdotti gli incubatori a secco, anche un altro sistema, la coltura a due fasi, ha raggiunto un'enorme popolarità. Dalla metà del primo decennio di questo millennio, le cliniche di PMA eseguivano il transfer degli embrioni allo stadio di clivaggio oppure cambiavano il terreno di coltura al giorno 3. Anche le poche aziende che hanno voluto resistere alla moda e hanno navigato controcorrente offrendo un unico terreno di coltura, hanno suggerito di cambiare il mezzo, una sorta di *refresh*, al giorno 3, come hanno confidenzialmente detto: "non per motivi scientifici, ma è il parere del legale dell'azienda". Retrospectivamente, non c'è da stupirsi che gli incubatori a secco abbiano funzionato bene in queste circostanze (Mori et al., 2011).

I problemi sono sorti quando alcuni laboratori hanno ripreso ad eseguire colture ininterrotte dal giorno 1 al giorno 5. Questa tendenza è nata per lo più da un'altra nuova moda: seguire lo sviluppo embrionale nei sistemi time-lapse, per consentire agli embriologi clinici di fare la valutazione standard al giorno 3 senza aprire l'incubatore. Tuttavia, in alcune cliniche, la coltura ininterrotta ha causato una diminuzione della qualità degli embrioni e dei risultati dei transfer. La colpa è ricaduta sui soliti sospettati, la mancanza di nutrienti e l'accumulo di prodotti metabolici tossici, e si è quindi tornati al refresh di terreno al giorno 3. Curiosamente, in altri laboratori che utilizzavano incubatori umidificati, il problema non si presentava. Ci sono voluti anni per mettere insieme i pezzi e capire che il sottile strato di olio che ricopriva le gocce rallentava, ma non impediva del tutto, l'evaporazione del terreno e che l'osmolalità gradualmente crescente comprometteva lo sviluppo embrionale. Quattro o cinque giorni di coltura ininterrotta erano semplicemente troppi per essere tollerati dagli embrioni.

Solo pochi mesi fa, abbiamo avuto l'occasione di contattare il simpatico ragazzo che vent'anni prima era stato responsabile del progetto dell'incubatore toploader da banco. Ora è un importante dirigente della stessa azienda. Lui stesso si è ricordato della nostra collaborazione e i suoi ultimi commenti sono stati del tutto appropriati: "Sì, avevate ragione; adesso abbiamo iniziato a muoverci verso l'umidificazione".

Abbiamo controllato la loro pagina web; l'incubatore ad atmosfera umida è stato effettivamente presentato, anche se con un design molto semplice. Non abbiamo dubbi, tuttavia, che tra dieci anni la maggior parte delle aziende offrirà simili incubatori *deluxe* a prova di bomba dotati di sensori, display (che mostrano le medie giornaliere, settimanali e mensili), allarmi online con segnali acustici *in loco*, e che i prezzi dei nuovi modelli raggiungeranno vette da capogiro.

Ma è davvero necessario? Non c'è modo di semplificare?

*Vi avvertiamo: ciò che state per leggere di seguito non è per i deboli di cuore e sicuramente non per i responsabili coinvolti nella realizzazione e attuazione dei protocolli di accreditamento.*

## Un'idea sorprendente

Quindi, vi suggeriamo di dimenticare quello che è accaduto sinora, il fatto che nel 2021 siamo circondati da auto a guida autonoma, supercomputer e *machine learning*. Utilizziamo per un breve momento il nostro cervello munito di un'intelligenza quasi preistorica. Cosa abbiamo bisogno (e di cosa non abbiamo bisogno) di fornire alla nostra piastra di coltura per embrioni umani?

- valori accurati, affidabili e consistenti dei parametri essenziali, tra cui temperatura, umidità, concentrazione di ossigeno, azoto CO<sub>2</sub>;
- rapido aumento (o diminuzione) di questi valori proprio e solo al livello ottimale all'inizio dell'incubazione;
- un sistema con possibilità minime e controllabili di causare danni da tossicità o infezioni e zero possibilità di cross-contaminazione;
- per la tranquillità degli embrioni, un sistema intrinsecamente affidabile basato sulla minor quantità possibile di incongruenze e fattori di rischio;
- per la tranquillità degli embriologi, un sistema che non necessita di programmazione, regolazioni, controlli quotidiani, manuali complicati, manutenzione e preoccupazioni;
- per il bilancio delle cliniche e dei pazienti, un metodo di incubazione con un investimento minimo e spese di gestione estremamente ridotte;
- e per la PMA, una grossa preoccupazione da eliminare dal lavoro quotidiano.

Sembra un sogno, ma in realtà ci siamo molto vicini. Per soddisfare questi requisiti abbiamo bisogno di

- un incubatore individuale per ogni paziente, con pareti sterili monouso;
- un sistema chiuso senza scambi di gas durante l'incubazione;
- un metodo che fornisca un ambiente quasi ottimale già prima dell'inizio dell'incubazione e che non necessiti di controlli sofisticati per dimostrare che funziona in modo costante e accurato;
- un sistema costruito utilizzando il minor numero possibile di apparecchiature in funzione - quelle che devono funzionare continuamente dovrebbero essere le più affidabili in un laboratorio biologico;
- una modalità semplice e agevole per il pronto intervento in caso di guasto (molto inverosimile);
- una fornitura di gas che duri fino a sei mesi e che richieda controlli della concentrazione e test biologici una sola volta in questo arco di tempo;
- una stabilità ineguagliabile con qualsiasi incubatore esistente, fornendo un'atmosfera di gas invariata per un periodo di sei mesi, indipendentemente da qualsiasi cambiamento nell'aria del laboratorio.

Potrebbero esistere diverse soluzioni per soddisfare questi requisiti. Noi non ne abbiamo trovate, tranne questa:

- prendere un *sacchetto sterile di foglio laminato*, impermeabile a tutti e tre i componenti della miscela tri-gas;
- inserire una piastra di coltura nel sacchetto, *sigillarlo* con un sigillatore regolato alla temperatura minima necessaria;
- inserire in un angolo un ago 18G e *iniettare nel sacchetto la miscela di gas preriscaldata, umidificata e filtrata*, sollevando contemporaneamente il coperchio della piastra afferrandolo dall'esterno sacchetto;
- rimuovere l'ago e manualmente *comprimere il sacchetto facendo uscire la miscela di gas*;
- *ripetere* queste operazioni di riempimento/espulsione per tre volte per garantire il completo scambio di gas all'interno;
- riempire il sacchetto fino a circa il 70% del suo volume con la miscela di gas, quindi *sigillare il foro e immergere* il sacchetto in un bagno d'acqua circolante.

Benvenuti nel SIS, il *Submarine Incubation System*, pubblicato per la prima volta nel 1998 (Vajta et al.) e poi utilizzato per oltre un milione di embrioni di mammiferi, compresi quelli umani, bovini e suini, per una coltura continua e ininterrotta per 1+4, 7 e 5 giorni, rispettivamente. Si veda la Fig. 7 e il relativo video:

<https://vimeo.com/34544754>.

*Solo alcuni suggerimenti pratici*, per chiarire le questioni ancora aperte ed eliminare eventuali preoccupazioni:

1. Fornitura di gas. Una bombola di gas standard di grandi dimensioni (1,5 m) riempita con la miscela tri-gas scelta può alimentare i SIS di una clinica di PMA di medie dimensioni (300-500 cicli/anno) per sei mesi. Il manometro è collegato, attraverso un filtro a carbone in linea (da sostituire, se occorre, secondo le istruzioni del fornitore), ad un umidificatore autoclavabile con filtro in pietra a bolle fini e acqua sterile. L'umidificatore deve essere mantenuto su un piano riscaldato a 37-39°C, a seconda della specie. La miscela di gas umidificata e riscaldata è nuovamente filtrata con un filtro sterile monouso da 0,2 µm, quindi collegata a un ago monouso da 18G.

2. Sacchetto metallico. I comuni sacchetti di plastica monostrato NON sono adatti allo scopo perché sono permeabili ai gas. Anche i sacchetti in foglio laminato differiscono tra loro per numero e materiali utilizzati negli strati, permeabilità e potenziale tossicità in caso di surriscaldamento durante la sigillatura. Le specifiche dei produttori potrebbero non essere adeguate a trovare il prodotto giusto. **CONSIGLIAMO VIVAMENTE DI CONTATTARCI** per avere il sacchetto adatto, utilizzato con successo da vent'anni.

3. Sigillatore. Un sigillatore a pressione in ferro (come mostrato nella Fig. 7: h) è disponibile su molti siti online. Consigliamo di non acquistare il prodotto più economico, ma sicuramente non è necessario uno strumento sofisticato: un prodotto simile a quello in figura, di un produttore attendibile, per un massimo di 100USD, dovrebbe andare bene. Occorre regolare il grado di calore su un sacchetto di alluminio SENZA embrioni (la prova è necessaria solo la prima volta). Premete con forza il manico e mantenete in pressione per alcuni secondi anche dopo lo spegnimento del calore. Il foglio di alluminio non deve attaccarsi alle superfici metalliche ma deve risultare ben chiuso in tutta la sua lunghezza.

4. Bagno d'acqua. Può andar bene qualsiasi bagno ad acqua circolante disponibile in commercio. Sugeriamo di prendere marche affidabili e forme/parametri appropriati, come il Thermo-Fisher Precision CIR 35, TSCIR35 (*nessun interesse commerciale!*) con una stabilità e uniformità di temperatura di 0,1°C e 0,05°C, rispettivamente. Per tenere i sacchetti immersi vi si possono appoggiare sopra dei porta-provette di plastica con sopra un peso (per esempio fiasche piene d'acqua). Un bagno d'acqua può ospitare embrioni per 12-16 pazienti.

Venti anni fa, in Australia, è stato prodotto un bagno d'acqua professionale, fatto appositamente per 24 sacchetti/pazienti (come nel video). Purtroppo, il produttore è andato in pensione e i nuovi gestori ne hanno interrotto la produzione. Per chi fosse interessato, sono disponibili dettagli tecnici e descrizioni.

Per prevenire la contaminazione, si dovrebbero usare i comuni disinfettanti per i bagni d'acqua (come il trattamento SigmaClean, Sigma-Aldrich, S5525). È inoltre consigliabile evitare il contatto diretto con l'acqua utilizzando guanti monouso.

Esistono altre due opzioni. Si possono usare bagni d'acqua trasportabili (vedi Fig. 7: c, d, e) per un trasporto sicuro a lunga distanza durante il periodo di coltura degli embrioni o prima del transfer. Oppure, nel caso in cui si preferisca non utilizzare bagni d'acqua, si possono semplicemente mettere le buste di alluminio piene nei ripiani di un comune incubatore (non gasato, nemmeno umidificato) (vedi Fig. 7: f). Anche se il tasso di recupero sarà inferiore e la stabilità della temperatura sarà leggermente ridotta rispetto alla coltura nel bagno d'acqua, questo sistema è comunque più vantaggioso rispetto ai comuni metodi di incubazione.

Si noti inoltre che, in caso di estrema emergenza, se si dispone dei sacchetti SIS, è sufficiente avere acqua calda e fredda (rispettivamente da un fornello a gas e dal rubinetto) e di un semplice termometro per mantenere gli embrioni vivi e felici.

NON vogliamo elogiare ulteriormente la nostra creazione. Se non siete convinti e avete bisogno di ulteriori argomentazioni, riprendete a leggere la pagina precedente e confrontate i vantaggi-svantaggi teorici del SIS rispetto agli incubatori disponibili sul mercato mondiale.

Certo, è necessario investire 2-3 minuti di lavoro al momento del caricamento. Non pensiamo che sia molto, a paziente. Comprendiamo certo che una "rapida occhiata" agli embrioni è più complicata in questo caso. Questo lo consideriamo il GRANDE VANTAGGIO del SIS.

Infine, siamo consapevoli che il SIS non sia così sofisticato, misterioso e professionale come i prodotti dei marchi leader. Tuttavia, potreste chiedere ai vostri embrioni cosa ne pensano? (Vedi Fig. 7: h)





Fig. 7: Il Sistema di incubazione sottomarina (SIS). a: Rack per provette in plastica contenente un sacchetto di foglio laminato (non trasparente) a sua volta contenente la piastra di coltura. Per mantenere il rack sommerso, una fiaschetta piena d'acqua viene posta sulla parte superiore del rack. b: Bagno d'acqua contenente quattro rack, ciascuno con quattro sacchetti, cioè gli embrioni di quattro pazienti. c: Nei bagni d'acqua trasportabili, per evitare che la fiaschetta sulla parte superiore del rack scivoli, è preferibile usare al

suo posto un sacchetto di foglio laminato riempito di sabbia sterilizzata. d: Il rack contenente i sacchetti viene stabilizzato aggiungendo un altro rack lateralmente. e: Il bagnetto che abbiamo utilizzato per il trasporto di embrioni bovini e suini. f: I sacchetti possono essere collocati anche in un comune incubatore a scatola (si vedano gli svantaggi e i vantaggi nel testo). g: Termo-sigillatore a pressione con ferro largo: lo strumento adatto per sigillare le buste di alluminio del SIS. h: Blastocisti bovine in day-8, in hatching e completamente "hatchate", mantenute nel SIS dal day-1 al day-7. *Nota per gli embriologi clinici: gli embrioni bovini contengono molti più lipidi di quelli umani. Gli embrioni qui mostrati sono molto simili alle blastocisti bovine sane prodotte in vivo e recuperate mediante flushing.*

## 1. II PRELIEVO

*" L'efficienza complessiva viene ridotta dagli effetti cumulativi di una serie di passaggi apparentemente efficienti "*  
First and Parish, J. *Reprod. Fertil.* S34 151-165, 1987

e, per l'embriologo, inizia con il prelievo degli ovociti.

Se volete evitare i molteplici dilemmi causati dalle varie descrizioni e dai suggerimenti talvolta contraddittori dei manuali e delle guide, vi consigliamo vivamente di seguire la guida compatta e assolutamente affidabile di Krisher e Schrenker (2019).

Abbiamo solo un dubbio su uno dei loro consigli, ovvero l'uso delle *camere ad atmosfera e temperatura controllata (isolette chamber)*. A nostro avviso, non è una necessità assoluta qualora la ricerca di ovociti venga fatta nel laboratorio di embriologia, anzi, potrebbe rallentare la procedura. Il tempo, così come la temperatura, è un fattore assolutamente cruciale in tutto il lavoro sugli ovociti e sugli embrioni.

Ci scusiamo dell'analogia, ma le ovaie delle mucche macellate possono essere mantenute a 20°C per 6 ore o anche più durante il prelievo e il trasporto in laboratorio. Tuttavia, una volta che gli ovociti immaturi vengono rimossi dal follicolo, devono essere mantenuti rigorosamente a 39°C (la temperatura interna dei bovini) e il tempo massimo per raggiungere l'incubatore non deve superare i 45 minuti, per ogni ovocita. Considerando il carico di lavoro di un laboratorio di animali d'allevamento dove si prelevano da 400 a 800 ovociti al giorno, soddisfare questo requisito è un compito logisticamente molto impegnativo ma è uno dei fattori chiave che spiega le grandi differenze tra i gruppi di successo e quelli medi. Negli esseri umani non si lavora con tali quantità; il compito è più semplice. Tuttavia, si deve ridurre al minimo questo tempo ed evitare qualsiasi evento che possa interferire con il flusso di lavoro.

Nell'uomo, ci si aspetta di ottenere ovociti maturi pronti per l'inseminazione, quindi il periodo di tempo che trascorrono in incubatore è di poche ore. Nonostante ciò, e soprattutto se è richiesta la maturazione in vitro, si deve cercare di tenerli in un ambiente tranquillo e indisturbato. Se non è possibile utilizzare un incubatore per ogni paziente, possono aiutare una porta d'ingresso semi-divisa e un'apertura-chiusura rapida. La rimozione dall'incubatore della piastra contenente gli ovociti ("solo per ricontrollare") deve essere rigorosamente evitata prima della fecondazione o della ICSI.

La classificazione morfologica dei complessi cumulo-ovocita e degli ovociti decumulati è da decenni parte integrante dei protocolli di laboratorio. Purtroppo, il valore predittivo delle comuni caratteristiche ovocitarie è limitato. Rienzi et al. (2010) hanno riassunto i risultati di cinquanta lavori che trattano dieci caratteristiche comunemente osservate. Nessuna di esse è da ritenersi di valore predittivo per la competenza evolutiva. Di conseguenza, il nostro suggerimento è di utilizzare tutti gli ovociti prelevati e di effettuare una selezione nelle successive fasi di sviluppo.

## 2. METTERE INSIEME I PEZZI

*Il sesso è emozione in movimento*  
Mae West

*(Scuse da GV)*

*Una delle mie varie strane abitudini è quella di distogliere lo sguardo durante le scene di sesso nei film. Ciò non ha nulla a che vedere con l'imbarazzo, il pudore o considerazioni religiose. Semplicemente non mi piace essere un osservatore passivo, un "voyeur". Nemmeno in laboratorio. Aggiungo rapidamente il seme, e subito metto i gameti al buio nell'incubatore. Mi interessa solo il risultato, non il modo in cui avviene.*

*Allo stesso modo, preferisco evitare l'argomento. Quando si tratta di sesso, bisogna farlo, non raccontarlo.*

*Bene, direte voi, allora passiamo alla ICSI. Questa è un'altra storia. Nei bovini non funziona e non è veramente necessaria. Abbiamo miliardi di paillettes piene di spermatozoi sani ed energici. Dopo una semplice capacitazione e l'unione dei gameti, il tasso di clivaggio può superare il 90%. Nei maiali invece, la FIV è estremamente inefficace, ma nel nostro laboratorio non ne abbiamo avuto bisogno. Il nostro progetto era limitato al trasferimento nucleare in cellule somatiche. Infine, negli esseri umani, sono stato troppo pigro per impegnarmi ad acquisirne le conoscenze. Non per via della micromanipolazione; ho fatto clonazione tradizionale per anni nei bovini. Semplicemente ho avuto poche opportunità e non ero molto interessato. C'era sempre qualcun altro che la faceva.*

Quindi, tralasciamo questo specifico argomento sul quale rimandiamo all'enorme quantità di articoli scientifici, review, capitoli di libri e manuali che lo trattano. Invece, per dare contenuto a questo capitolo, permetteteci di parlare di un argomento più generale, che fa parte di tutte le fasi del nostro lavoro in laboratorio, in particolare alla fecondazione: l'uso delle pipette per la manipolazione di ovociti ed embrioni.

### Pipettare

*La maggior parte dei progetti richiede tre mani*  
Arthur Bloch: La legge di Murphy, Machinesmanship

Nel laboratorio di embriologia, la maggior parte del tempo la passiamo allo stereomicroscopio, reggendo, spostando o tenendo ferma la piastra con una mano. L'altra mano (quella dominante) è necessaria per tenere, spostare e stabilizzare la pipetta. Mantenere la punta della pipetta con un controllo assoluto a livello microscopico è fondamentale in un lavoro delicato. Una terza mano è necessaria per regolare la pressione all'interno della pipetta e pipettare gli embrioni dentro e fuori. Purtroppo, tranne rari casi fortunati, la maggior parte degli embriologi non possiede una terza mano.

Se la pressione viene regolata dalla mano che tiene la pipetta, la punta si sposta. Né una mano ferma né decenni di esperienza possono evitare movimenti indesiderati apparentemente trascurabili. Tuttavia, alla fine del puntale (e della giornata) l'effetto di questi piccoli movimenti sarà tutt'altro che delicato e tollerabile. E il meccanismo molecolare dello *shear stress* non controllato causato da una manipolazione inappropriata è già stato descritto (Mortimer et al., 2018), anche se a pochi interessa.

(Naturalmente, la maggior parte di voi dirà: "Beh, non si deve fare di un mucchietto di terra una montagna. Posso lavorare perfettamente con ..., ...,<sup>2</sup> è solo una questione di pratica...". Ok! Possiamo suggerire una prova? Prendete in mano una penna come si impugna un micropipetta - palmo rivolto verso l'alto, pollice sull'estremità lontana - e iniziate a scrivere muovendo il pollice su e giù. Oppure prendete una penna come se fosse una pipetta da decumolazione (la solita posizione di scrittura) e cambiate continuamente la

---

<sup>2</sup>Aggiungi il tuo dispositivo preferito - non abbiamo intenzione di provocare alcuna grande azienda internazionale

pressione tra il pollice e l'indice, mentre scrivete un testo con una bella calligrafia - che è comunque molto meno impegnativo che pipettare con precisione ovociti ed embrioni. Buona fortuna).

È curioso come non sia stato sempre un problema. Un approccio del 20° secolo, la pipetta a bocca, utilizzava bocca, denti e lingua ed è stato lo strumento standard utilizzato dagli embriologi per più di un secolo. Non diciamo fosse geniale, era un po' scomoda e magari disgustosa, ma serviva al suo scopo in modo appropriato. Tuttavia, nel 21° secolo le autorità non hanno voluto fosse utilizzata a causa del "*grave rischio di infezione*" sia a valle che a monte. In realtà, il pericolo di infezione poteva essere eliminato completamente isolando ermeticamente le due estremità attraverso una piccola camera di plastica dotata di una membrana flessibile e impermeabile, ma questa opzione da 2 o 3 dollari è stata semplicemente ignorata.

Tuttavia, alcuni embriologi nostalgici e di vecchia scuola hanno continuato ad usare, a porte chiuse, la pipetta a bocca, sia per spostare ovociti ed embrioni che per vitrificare. A volte, ma neanche così eccezionalmente, veniva utilizzata anche con i micromanipolatori, per le pipette da *holding* e talvolta anche per iniettare il seme. Poi sono arrivati il COVID e le mascherine obbligatorie che hanno reso queste pratiche altamente irresponsabili. La pipetta a bocca è ormai storia, una curiosità da Medio Evo.

Anche prima di questo divieto totale e irrevocabile, con il nostro collega Peter Kragh abbiamo cercato di trovare un'alternativa. La precisione delle pipette a bocca era assolutamente indispensabile per la clonazione manuale (*handmade cloning*, HMC), una versione senza micromanipolatori del trasferimento nucleare da cellule somatiche. Tuttavia, dopo una giornata di clonazione, la nostra bocca era in preda agli spasmi e non riuscivamo quasi più a mangiare (o, ancora più tragicamente, a bere).

## II POP

La soluzione più ovvia era quella di utilizzare altre estremità, ma la scelta era limitata. La pipetta a pedale (*pedal operated pipette*, POP) sembrava essere l'unica soluzione realistica. Sentiamo già le forti proteste: "Oh, no! Un piede per un lavoro così delicato? Siamo matti?".

Beh, avete la patente di guida? Sapete come si pipetta a bocca, se lo fate correttamente?

Di fatto, anche la pressione e l'aspirazione che si producono a bocca sono drastiche e non controllabili: non possono essere applicate direttamente sugli embrioni. È necessario aumentare la resistenza delle soluzioni all'interno della pipetta per rendere il movimento lento e controllabile. Questo può essere fatto

- utilizzando un capillare lungo e stretto

- riempiendolo con piccole colonne che non si mescolano tra loro: olio, aria, mezzo, olio, aria, ecc.

Maggiore è il numero di colonne, maggiore è la resistenza che si crea. La quantità ottimale di colonne si raggiunge quando si riesce ancora a muoverle con uno sforzo ragionevole, ma tutto il movimento si interrompe quando si stacca la bocca dal boccaglio. Se le soluzioni continuano a muoversi, bisogna aggiungere altre colonne. Se le soluzioni diventano troppo lente e difficili da muovere, si deve espellere tutto e ricominciare.

Ogni volta che si inizia a lavorare, è necessario caricare correttamente il capillare. È sempre stata una procedura automatica per gli embriologi esperti, richiedeva alcuni secondi per essere eseguita e qualche giorno per essere acquisita. Non un grande investimento. Una volta che il capillare è caricato correttamente, è possibile utilizzare qualsiasi tipo di pressione, indipendentemente dall'origine: con la bocca, con la mano, con il piede o altro.

Il nostro primo modello POP non era molto sofisticato. Una base di legno. Un tubo spesso flessibile, chiuso ad un'estremità e collegato all'altra estremità alla pipetta attraverso un tubo sottile lungo. Un pedale in legno collegato alla base da una cerniera. Il tubo spesso era fissato tra il pedale e la base (vedi Fig. 8). È bastato un semplice lavoro manuale di mezz'ora nel nostro garage poco attrezzato.

Il risultato è stato sorprendente. Il pedale funzionava molto meglio di quanto ci si potesse aspettare. L'unico problema era che non potevamo sollevare le gambe senza che la soluzione nel capillare si muovesse. Ma un adeguato posizionamento della cerniera ha risolto il problema. Inoltre, quando avevamo bisogno di riposare, bastava semplicemente rimuovere la pipetta dal tubo di plastica.

Per di più, per imparare a lavorare con il POP è bastata mezz'ora di autoformazione (chi avrebbe potuto insegnarci?) e in un giorno siamo riusciti a eseguire tutte le manipolazioni richieste per la HMC con la stessa precisione della vecchia pipetta a bocca.

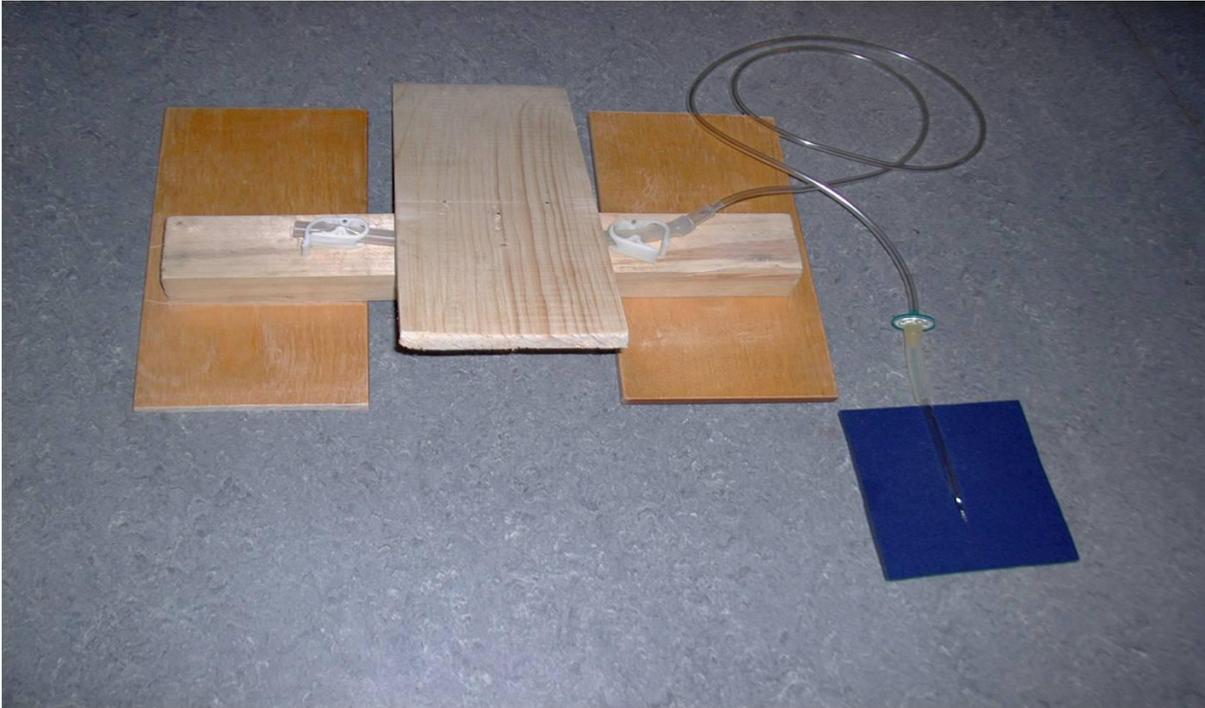


Fig. 8: Il primo POP al mondo. Questo strumento rudimentale è stato utilizzato con successo per anni per i programmi di clonazione manuale (HMC) nel suino a Foulum, Università di Aarhus, Danimarca. NB: l'HMC nei suini è probabilmente il lavoro sugli embrioni più delicato che sia mai stato eseguito di routine senza micromanipolazione.

"Beh", vi chiederete, "non potrebbe essere un po' più professionale? Con un po' di elettricità, pompe, ecc...?".

È possibile. Ecco il disegno per la configurazione e la relativa soluzione tecnica. Il pipettatore, il vecchio tipo. Forse ne avete più di uno nel vostro laboratorio. Perfetto.

- un pulsante premuto: espulsione, velocità proporzionale alla pressione;
- l'altro pulsante premuto: aspirazione, velocità proporzionale alla pressione;
- entrambi i pulsanti vengono rilasciati: tutto si ferma.

Non si potrebbe avere di meglio. È sufficiente creare un pedale adeguato e collegarlo al regolatore e alla pompa. Si può anche aggiungere un po' di estetica.

"Ma se è così semplice, perché non è ancora stato prodotto?". Perché non è presente in ogni laboratorio, in più copie, su ogni banco di lavoro e in ogni cappa?

Forse, con un po' più di capacità manageriali e di marketing, potremmo diventare milionari grazie a questa invenzione. Abbiamo fatto del nostro meglio. Abbiamo iniziato 15 anni fa, poi abbiamo ricominciato più

volte. Non potevamo avere meno successo. Tutte le aziende erano impegnate in altro. Le loro risposte sembravano fotocopiate. La parola ricorrente era: "Purtroppo...".

Quindi, Signore e Signori, che il gioco abbia inizio! Chi prima arriva meglio alloggia. Potrebbe anche non essere necessario raggiungerci. La nostra ricompensa sarebbe il fatto di non portarci la nostra invenzione nella tomba.

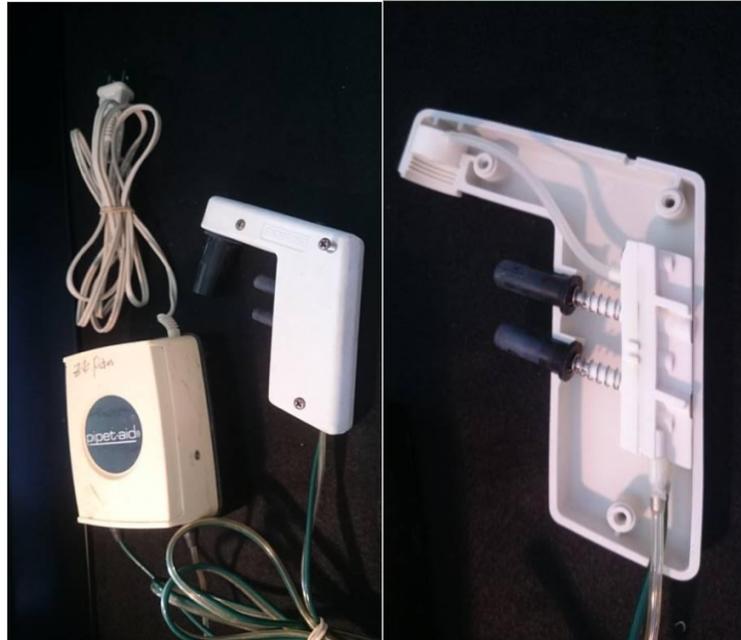
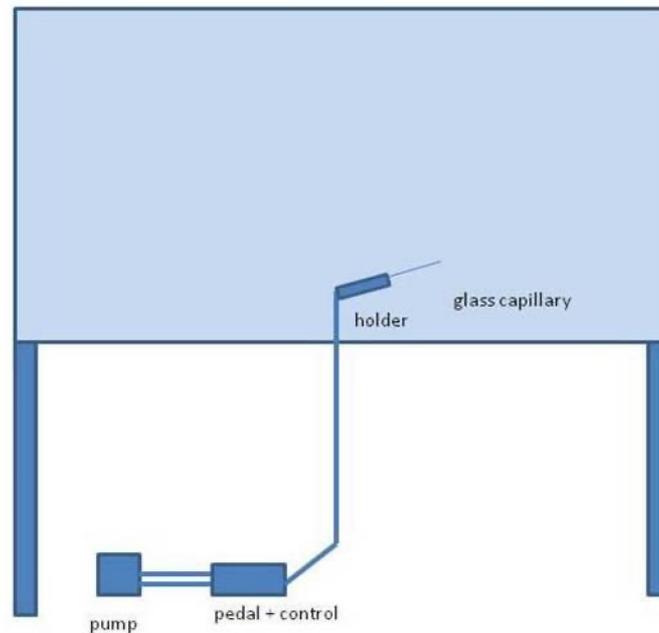


Fig. 9: a: Lo schema per realizzare il POP - per mancini; b: Un vecchio modello di pipettatore con la pompa separata; c: La struttura del regolatore di pressione - una possibile versione del POP.

### 3. LA CULTURA

*Fare del proprio meglio non è più sufficiente.  
Ora dobbiamo fare ciò che sembra impossibile.*  
Greta Thunberg

Recentemente, un giovane esperto di fama mondiale ha tenuto una conferenza in un webinar sugli approcci innovativi nella coltura embrionaria. L'intervento non conteneva un solo punto o una sola affermazione che non fosse già stata discussa e dichiarata in riviste pubblicate 10-12 anni fa. L'unica novità era l'evaporazione, ma questo è un problema che abbiamo creato noi stessi solo di recente.

Non si possono trarre conclusioni generali da un singolo evento. Riassumiamo quindi brevemente uno studio pilota che riguarda i lavori sulle colture embrionali (Vajta et al., 2021). Nel 2019, su 983 articoli di ricerca pubblicati da cinque riviste leader nel settore della riproduzione umana, solo 12 (1,2%) hanno esaminato le condizioni di coltura degli embrioni, e tra questi solo 4 (0,4%) erano incentrati sull'ambiente fisico.

Si potrebbero elencare altri casi tra conferenze e webinar ma, senza dubbio, questa triste impressione sarebbe confermata. In netto contrasto con i decenni precedenti, i dettagli tecnici sulla coltura embrionale sono attualmente fuori dal focus della ricerca sulla riproduzione assistita umana. Probabilmente abbiamo percorso tutte le strade possibili, studiato tutti i fattori, standardizzato la maggior parte dei dettagli. Ciò che rimane è solo una messa a punto. Dobbiamo concentrare le nostre energie su questioni più importanti.  
*Task accomplished.*

Lo è? Basti pensare che la coltura degli embrioni ha sempre avuto un ruolo cruciale nella riproduzione assistita umana. La sua importanza è aumentata ulteriormente un decennio fa, quando la coltura a blastocisti è diventata l'approccio standard nella maggior parte dei laboratori principali. Allo stesso tempo, però, la ricerca su di essa è diminuita drasticamente.

#### **I terreni di coltura**

Entriamo nel dettaglio. Fino a trenta o anche venti anni fa, facevamo tutto da soli nel nostro laboratorio di animali d'allevamento. Sterilizzavamo l'acqua, aggiungevamo ogni composto, separatamente e appropriatamente. Praticamente ogni preparazione di terreno di coltura era l'inizio di un nuovo esperimento. Nel 99% delle volte non si avevano miglioramenti, ma per il restante 1% il tentativo era valso la pena.

È stato per noi quasi imbarazzante, se non ridicolo, constatare che articoli e poster in ambito umano focalizzassero l'attenzione sul confronto tra terreni di coltura commerciali pronti all'uso, di cui era sconosciuta la composizione: praticamente solo "nomi in codice". Davvero? Si può considerare scienza?

In dieci anni, questo tipo di "ricerca" è diventato lo standard ma dopo altri dieci anni anche questi articoli sono passati di moda. Ragioni legali e pratiche hanno costretto i laboratori ad abbandonare gli studi sui terreni di coltura - ora anche nell'ambito degli animali - e a procedere lungo strade più funzionali e sicure, scegliendo il terreno più economico prodotto da qualche azienda di fama internazionale e distribuito da un abile incaricato. Il classico commento, ora riconosciuto anche da manuali e review, era "Non possiamo competere con i loro standard".

Questa tendenza è ovviamente difficile da invertire e la spiegazione è più o meno logica. Il terreno commerciale piace a tutti. Per le autorità è un chiaro vantaggio perché è facile stabilire degli standard e controllare la qualità. Per gli embriologi è meno lavoro e meno problemi di cui preoccuparsi. Per le aziende un colpo grosso. Per i pazienti una sicurezza: anche se devono pagare una fortuna (non solo per i terreni), si sentono rassicurati che i loro soldi sono ben spesi.

Lo sono davvero? Questi terreni sono davvero "i migliori", quelli "ottimali", come pubblicizzato dalle aziende sui siti web e scenograficamente presentato nelle aree esposizione dei meeting?

Per più di 20 anni, nella PMA, ci sono stati accesi dibattiti tra chi sosteneva fosse opportuno trasferire gli embrioni al giorno 3 e chi invece riteneva fosse meglio farlo al giorno 5. Quest'ultimo gruppo ha subito poi un'ulteriore spaccatura riguardo alla necessità o meno di rinnovare il terreno con un refresh nel corso della coltura e poi, di nuovo, se questo refresh dovesse essere fatto utilizzando lo stesso tipo di terreno o un terreno diverso. Dieci anni fa, i sostenitori del mezzo sequenziale (a due fasi) sembravano aver avuto la meglio, tanto nel campo della FIV umana quanto nei manuali, nelle review, alle esposizioni e con i clienti. Erano pochi i sostenitori del terreno singolo che resistevano, e questi erano soprattutto tra quelli che lavoravano sugli animali.

Poi, tutt'assieme, come accennato prima, un'inaspettata questione tecnica ha involontariamente sovvertito il Kulturkampf<sup>3</sup>. Le modifiche apportate ai mostruosi arcaici microscopi time-lapse hanno generato un effetto dirompente. L'applicazione in rapida ascesa nella PMA dei nuovi modelli (Primo Vision, Embryoscope) ha eliminato la necessità di interrompere le colture al giorno 3 per la classica valutazione morfologica degli embrioni. Ci si è presto resi conto che il cambio di terreno in terza giornata era di fatto scomodo e portava benefici molto discutibili. Le poche aziende che già producevano terreni singoli ne hanno aumentato rapidamente la produzione, altre sono tornate e altre ancora entrate *ex novo* in questo campo. La sconfitta più dolente dei sostenitori del sequenziale è avvenuta quando il principale produttore è stato costretto ad arrendersi e a produrre un terreno singolo per poter soddisfare il bisogno del suo stesso sistema time-lapse che aveva fatto schizzare i suoi guadagni alle stelle.

E questo è quanto sul ruolo della scienza nel far prendere le decisioni.

Il ritorno alle colture ininterrotte può essere accolto come un progresso: lo abbiamo usato per vent'anni sui nostri embrioni bovini e suini con risultati molto convincenti. Anche su altri campi di battaglia sta lentamente avvenendo una quieta convergenza; le differenze tra concetti come "tornare alla Natura", "l'algoritmo del simplesso" o "prima, seconda, terza generazione" sembrano dissolversi. Oppure, semplicemente, non se ne parla perché riguardo ai terreni di coltura abbiamo limitate informazioni sui composti e sulle loro concentrazioni. Ad ogni modo, negli ultimi decenni, incidenti gravi legati all'uso di terreni commerciali non si sono verificati.

Tuttavia, non c'è motivo di desistere e abbandonare la ricerca in questo campo. Non esiste un singolo composto chimico o biologico che sia utilizzato in tutti i terreni di coltura disponibili in commercio esattamente nella stessa concentrazione (Vajta et al., 2010; Pool et al., 2012). Studi recenti confermano inoltre che non c'è consenso su questioni fondamentali come il pH ottimale dei mezzi, la temperatura di incubazione, i sistemi di coltura singola ininterrotta rispetto a quelli bifasici e l'integrazione proteica (Reed et al., 2009; Swain 2015; Sfontouris et al., 2016; Mortimer et al., 2018; Baak et al., 2019; Krisher e Schlenker, 2019; Gatimel et al., 2020). Anche la maggior parte delle review che trattano aspetti della coltura embrionale riportano ampie differenze e di solito le review sistematiche che tentano di rispondere a una determinata domanda rimangono senza conclusioni.

Purtroppo, modificare la composizione di un terreno di coltura può essere illegale secondo le attuali normative. Vediamo quindi altri aspetti della coltura embrionale in cui l'immaginazione dei legislatori non è stata sufficiente a limitare la nostra attività creativa.

---

<sup>3</sup>Parola tedesca, inglobata nel lessico inglese, che significa "lotta tra culture", ad esempio quella di Reichskanzler Otto von Bismarck contro la Chiesa cattolica, e poi quella del Ministro della Propaganda del Terzo Reich, il dottor Joseph Goebbels, contro tutte le chiese.

## Gocce su superfici piatte<sup>4</sup>

ricoperte di olio. Questo è stato per decenni il sistema di coltura standard per gli embrioni di mammifero. Semplice ed elegante. Anche gli studenti di prima elementare possono realizzarlo facilmente se si fa loro mettere da parte il cellulare per due minuti (Fig. 10).

In realtà, la preparazione delle piastre è la fase da cui ha origine la maggior parte delle differenze, delle incongruenze e dei problemi. Quasi tutti i laboratori hanno un proprio metodo di preparazione delle gocce. È difficile trovare due procedure completamente identiche. Alcuni si limitano a mettere la goccia intera sulla superficie e a coprirla con l'olio; altri usano metà della quantità richiesta, coprono con l'olio e poi aggiungono il resto; oppure preparano la goccia usando la quantità richiesta, coprono con l'olio, poi rimuovono il mezzo e lo sostituiscono con del nuovo. Ovviamente, tutte queste manipolazioni danno luogo a gocce di forma, altezza e possibili caratteristiche osmotiche diverse già prima dell'aggiunta dell'olio a creare uno strato protettivo di spessore variabile sulla goccia.



Fig. 10: Preparazione delle micro-gocce. Una fase cruciale spesso trascurata.

Anche le superfici utilizzate per la preparazione delle gocce possono essere diverse. Esistono notevoli differenze tra piastre apparentemente identiche di diversa provenienza. Le aziende possono cambiare il rivestimento della superficie<sup>5</sup> senza preavviso (De Munck, *com. pers.*), provocando un cambiamento di forma in gocce fatte nello stesso identico modo. La temperatura ambiente del laboratorio, il piano di lavoro, la forma della base della piastra (a contatto diretto o meno con il piano riscaldato), il flusso d'aria delle cappe e persino la velocità dei ricambi d'aria possono influenzare l'evaporazione.

---

<sup>4</sup>Per maggiori dettagli e citazioni, si veda Vajta et al., 2021

<sup>5</sup>In realtà, il ruolo di questi rivestimenti per lo sviluppo embrionale è molto discutibile. Alcune aziende non applicano alcun rivestimento e le loro piastre non sembrano essere peggiori. In altre piastre, il danno procurato al rivestimento durante la preparazione manuale delle WOW (si veda più avanti in questo capitolo) non ha alcun effetto negativo sullo sviluppo di embrioni senza zona.

Swain (2019) ha pubblicato osservazioni spiacevoli riguardo l'osmolalità in relazione agli attuali sistemi di coltura. Ha affermato che 1) nonostante l'opinione generale, l'olio non impedisce l'evaporazione dei terreni di coltura; 2) il livello di evaporazione dipende dallo spessore della copertura di olio ed è determinato anche dalla forma e dalle dimensioni della goccia; 3) l'evaporazione aumenta l'osmolalità e il pH dei terreni di coltura insieme alla concentrazione di composti potenzialmente dannosi; e 4) l'evaporazione negli incubatori a secco (ora ampiamente utilizzati) può raggiungere livelli rischiosi, soprattutto durante la coltura ininterrotta fino allo stadio di blastocisti.

Dobbiamo renderci conto che, mentre ci occupiamo molto delle minuscole differenze di composizione dei terreni di coltura e del possibile effetto tossico di praticamente qualsiasi cosa entri in laboratorio, compresi i dopobarba usati dagli embriologi, sembriamo dimenticarci di alcuni dettagli che possono rendere i nostri sistemi di coltura intrinsecamente non idonei ancor prima di iniziare a usarli.

Per complicare ancor più le cose consideriamo anche un ulteriore fattore.

Gli *embrioni in vitro* sono esseri sociali e preferiscono stare insieme. Un gran numero di studi ha dimostrato gli effetti benefici della coltura in gruppo sul tasso di blastocisti e sul successivo sviluppo in vivo in varie specie di mammifero, compreso l'uomo. I principali meccanismi che si suppone favoriscano un migliore sviluppo nella coltura di gruppo sono la protezione, l'accomodamento e la comunicazione.

La *protezione* è necessaria perché, in coltura, diversi fattori nocivi potrebbero ritardare o bloccare lo sviluppo embrionale. Nella coltura di gruppo, gli embrioni possono aiutarsi a vicenda per neutralizzare o ridurre al minimo questi fattori. Un leggero miglioramento dovuto alla cooperazione tra embrioni può portare a un esito molto diverso, anche se il beneficio netto di questa protezione reciproca non è del tutto chiaro.

L'*accomodamento* è un altro fenomeno, solo parzialmente compreso. Il terreno immediatamente intorno all'embrione in via di sviluppo sembra differire dal resto del terreno di coltura per alcuni parametri fisici e chimici, tra cui il pH, la concentrazione di ossigeno, di nutrienti, ecc. È difficile costruire questo microambiente ma facile alterarlo a causa della grande quantità di terreno di coltura utilizzato, cambiato o mescolato durante lo spostamento della piastra. Nella coltura di gruppo potrebbe essere più facile ripristinare e stabilizzare questo ambiente.

Riguardo la *comunicazione* tra embrioni, potremmo avere maggiori prove sul suo ruolo attraverso l'uso di ligandi bioattivi. Nelle colture singole, fattori di crescita aggiunti ai terreni di coltura possono migliorare notevolmente lo sviluppo. In vitro, gli embrioni non sono esposti ai molteplici fattori autocrini, paracrini ed endocrini presenti nell'ovidotto. Questa differenza può essere parzialmente compensata dalla coltura di gruppo o dall'aggiunta di ormoni e fattori di crescita al terreno di coltura.

L'effetto del gruppo può dipendere da molti fattori, tra cui la specie in questione, il numero di embrioni, la disposizione, ecc. ma può risultare in un aumento del 20-30% del tasso di sviluppo a blastocisti e in una migliore qualità degli embrioni.

Nonostante tutto, *si preferisce che gli embrioni sviluppino singolarmente in vitro*. Nell'ultimo decennio, sempre più laboratori nei centri di PMA, hanno scelto la coltura individuale per i seguenti motivi:

- la maggior parte dei metodi di selezione degli embrioni richiede uno screening individuale;
- l'aumento dell'età media delle pazienti e la riduzione dell'intensità delle stimolazioni nei protocolli mild riducono il numero di zigoti;
- alcuni scienziati ritengono che la presenza nel gruppo di embrioni degenerati o morti possa influenzare negativamente lo sviluppo di quelli sani.

A prima vista, il modo più facile per ottimizzare le condizioni nelle colture singole è quello di *ridurre al minimo il volume delle gocce*; ciò sembra essere utile per ottenere un'adeguata concentrazione dei ligandi,

diminuire la quantità totale di composti potenzialmente dannosi e consentire al singolo embrione di creare e mantenere un microambiente adeguato. I dati relativi al volume minimo richiesto per un embrione durante l'intero periodo di coltura sono contraddittori; la maggior parte dei lavori suggerisce da 6 a 12  $\mu\text{l}$ . Tuttavia, secondo la nostra esperienza, nel sistema micro-capillare statico Glass Oviduct (GO) (vedi più avanti), meno di 1  $\mu\text{l}$  di volume è stato sufficiente perché un singolo embrione bovino mantenesse uno sviluppo adeguato fino allo stadio di blastocisti, per sette giorni di coltura ininterrotta (Thouas et al., 2003; Vajta et al., 2001). Poiché il sistema GO semichiuso è molto meno sensibile all'evaporazione, la necessità di una quantità maggiore di terreno quando si usano le gocce può essere spiegata con il danno osmotico e non dalla mancanza di nutrienti o dall'accumulo di composti metabolici tossici.

Come già detto, le dimensioni condizionano il risultato. Più piccola è la goccia, maggiori sono l'evaporazione relativa, la concentrazione dei composti (che può raggiungere livelli pericolosi) e il danno osmotico. Occorre inoltre considerare una semplice questione tecnica: la preparazione di 6 o 12 gocce piccole per una coltura individuale richiede più tempo, in assenza dello strato di olio protettivo, rispetto alla preparazione di 2 o 3 gocce grandi per colture di gruppo. Di conseguenza, a causa della maggiore evaporazione, i singoli embrioni possono trovarsi in una situazione già sfavorevole fin dal momento in cui vengono messi nel terreno di coltura.

Peraltro, il volume minimo di gocce utilizzato nelle colture singole, compreso tra 7 e 10  $\mu\text{l}$ , è di gran lunga maggiore rispetto al mezzo che circonda gli embrioni in vivo e può contenere contaminazioni dannose e diluire ampiamente i fattori necessari per un microambiente adeguato. Ciò può spiegare l'inadeguatezza dei tassi di sviluppo e della qualità degli embrioni coltivati in questo modo.

### **La terza dimensione**

Anche se tutto ciò che ci circonda avviene in tre dimensioni, noi esseri umani abbiamo ricostituito il mondo in 2D. Forse è iniziato con le prime pitture rupestri, e proseguito con i rotoli di papiro egiziani, poi con gli affreschi, i mosaici, le tele e i codici del Medioevo. La fotografia, il cinema, la televisione, gli schermi dei computer, i display dei cellulari: il nostro mondo virtuale era, ed è rimasto sino a oggi, bidimensionale. Un'eccezione può essere rappresentata dalle sculture e dall'architettura, ma la cultura, l'istruzione e la scienza si basano quasi esclusivamente su superfici piane. Gli sporadici tentativi di ricreare la terza dimensione - almeno nell'ambito dell'intrattenimento - sono sempre falliti. Tecnicamente possibili, ma la gente non è interessata.

Lo stesso approccio predomina nei nostri laboratori. Anche con i nostri "stereo" microscopi vediamo ovociti ed embrioni in due dimensioni; li immaginiamo in due dimensioni e forniamo loro un ambiente bidimensionale. Nonostante siano disponibili software e grafiche capaci di offrire immagini ed analisi tridimensionali, questi sono usati soprattutto per le illustrazioni o per analisi basate sull'intelligenza artificiale. La nostra intelligenza non sembra essere adeguata.

Per la maggior parte degli scopi, due dimensioni sono sufficienti. Tuttavia, quando parliamo di coltura di embrioni, potremmo aver bisogno di considerare anche altre opzioni. Non dimenticate mai: ciò che è buono per l'embriologo non è necessariamente buono per gli embrioni. E nel nostro laboratorio loro sono più importanti.

### **Canali e tubi**

Vent'anni fa, la microfluidica e i micro-canali erano la grande promessa per il futuro dell'embriologia. Con il passare degli anni, l'area è rimasta estremamente promettente e potrebbe rimanere tale per sempre<sup>6</sup> e incapace di contribuire praticamente al lavoro quotidiano di un laboratorio di FIV. Questioni tecniche,

---

<sup>6</sup>Analogamente: "Il Brasile è il paese del futuro... e lo sarà sempre". Charles de Gaulle

finanziarie e amministrative e la mancanza di cooperazione tra le diverse discipline giocano un ruolo chiave nel rendere minimo il progresso in questo campo. L'altra questione è che il principale valore pratico della microfluidica consisterebbe nella dinamicità delle soluzioni e dei campioni. Sebbene questo requisito possa essere utile per molte procedure, in embriologia potrebbe non essere necessario, o addirittura essere dannoso, per quanto riguarda la coltura embrionale, come dimostra l'insuccesso dei sistemi di coltura dinamica.

Certamente, un analogo primitivo statico dei micro-canali, il sistema GO, ha fornito chiare evidenze che tubi piccoli e stretti possono offrire un ambiente idoneo a sostenere lo sviluppo embrionale (Thouas et al., 2003). Micro-capillari di vetro sono stati utilizzati per caricare embrioni allo stadio unicellulare per capillarità. Immergendo manualmente il capillare nel terreno contenente l'embrione ricoperto d'olio, prima risale al suo interno una piccola colonna d'olio, poi  $<1 \mu\text{l}$  di terreno con l'embrione unicellulare ed infine, una volta ritratto, di nuovo l'olio. I due tappi di olio alle estremità separano efficacemente il terreno contenente l'embrione dall'atmosfera degli incubatori e lo sviluppo embrionale procede indisturbato per sette giorni. Nel caso degli embrioni di bovino, il tasso di blastocisti è risultato pari a quello ottenuto nelle colture di gruppo. Anche l'espulsione degli embrioni è semplice e non ne causa la perdita. Purtroppo, questo modello "*proof of concept*" per le colture individuali è rimasto inutilizzato a causa della mancanza di dispositivi di supporto, di finanziamenti e, in generale, di interesse.

#### **WOW: invenzione e risultati**

È curioso che sia sfuggita per molto tempo agli embriologi l'idea di creare delle piccole incisioni sul fondo di una piastra al fine di coltivare separatamente gli embrioni. Un sistema di questo tipo è stato pubblicato da Wood et al. nel 1993 per la coltura di embrioni, allo stadio di precompattazione e privi di zona pellucida, co-incubandoli per alcune ore in micro-pozzetti con cellule staminali embrionali, al fine di produrre delle chimere. In seguito all'introduzione di tecniche di trasferimento nucleare in assenza di zona pellucida, questo approccio è stato testato nel bovino con l'unico scopo di mantenere uniti i blastomeri di embrioni precompattati (Vajta et al., 2000; Peura e Vajta, 2003). I micro-pozzetti venivano preparati in piastre da quattro pozzetti (da cui il nome: Well of the Well o WOW), utilizzando delle asticelle metalliche disponibili in commercio ed esercitando una pressione meccanica sul fondo (Fig. 11). I WOW hanno compensato con successo la mancanza della zona pellucida e dell'effetto gruppo, impedendo il disassemblamento degli embrioni precompattati e mantenendo elevata la capacità di sviluppo sia in vitro che in vivo.

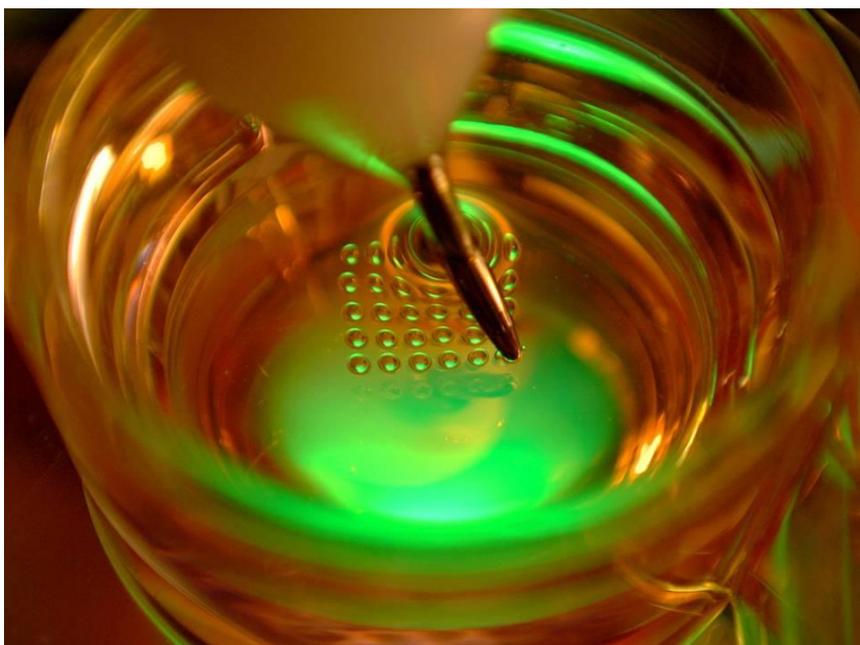


Fig. 11: Preparazione manuale delle WOW mediante un'asticella metallica

Inoltre, nonostante la procedura di preparazione fosse piuttosto rudimentale e richiedesse un'azione meccanica energica e decisa, il sistema WOW ha avuto un successo unico anche per altri scopi, tra cui la coltura individuale di embrioni con la zona intatta di varie specie di mammifero<sup>7</sup>. In generale, il sistema WOW ha compensato con successo la mancanza dell'effetto gruppo (Fig. 12, 13), anche quando un singolo embrione veniva coltivato in una goccia o in un pozzetto di grandi dimensioni. I pattern di espressione genica degli embrioni bovini coltivati in WOW erano più simili a quelli degli embrioni ottenuti in vivo rispetto a quelli coltivati su superfici piatte. Il sistema WOW è risultato superiore alle gocce per la coltura di embrioni suini prodotti in vitro in terreno semi-definito e per gli embrioni di ratto fino allo stadio di morula. I micro-pozzetti sono risultati in grado di mantenere lo sviluppo di embrioni singoli di topo con risultati simili a quelli della coltura di gruppo.

In un esperimento comparativo con embrioni umani fratelli, sono state raggiunte percentuali di blastocisti del 55% nelle colture in WOW contro il 37% nelle colture tradizionali in goccia. Un sistema di coltura simile ha portato, nell'uomo, ad un miglioramento degli outcome sia in vitro che in vivo. Nell'uomo, si è potuto osservare che, in un sistema di coltura a micro-pozzetti, la presenza di embrioni degenerati non influenza lo sviluppo degli embrioni nei pozzetti adiacenti.

Durante il nostro ampio lavoro con i WOW preparati manualmente, non abbiamo riscontrato alcun effetto positivo o negativo dell'utilizzo di un numero maggiore o minore di pozzetti (da 1 a 50) coperti con varie quantità di terreno (da 8 a 400 µl per WOW/embrione, in coltura singola ininterrotta fino allo stadio di blastocisti). La distanza tra i pozzetti è stata determinata empiricamente per rendere agevole la preparazione, il caricamento, la valutazione e la rimozione degli embrioni. L'utilizzo di distanze diverse tra pozzetti non influenza i tassi di sviluppo.



Fig. 12: Blastocisti espansa di bovino, clonata manualmente e coltivata fino al giorno 7. Si tratta di una blastocisti in WOW preparato manualmente. NB: a ore 12, si osservano blastomeri scuri degenerati; questi sono frequenti dopo la coltura senza zona. Durante lo sviluppo di embrioni con zona intatta, tali cellule vengono espulse nello spazio perivitellino, quindi compresse, lisate e digerite dal trofoectoderma in formazione. Gli embrioni senza zona non hanno bisogno di sprecare energia per “fare pulizie”.

<sup>7</sup> Si vedano tutti i principali riferimenti in: Vajta et al., 2021

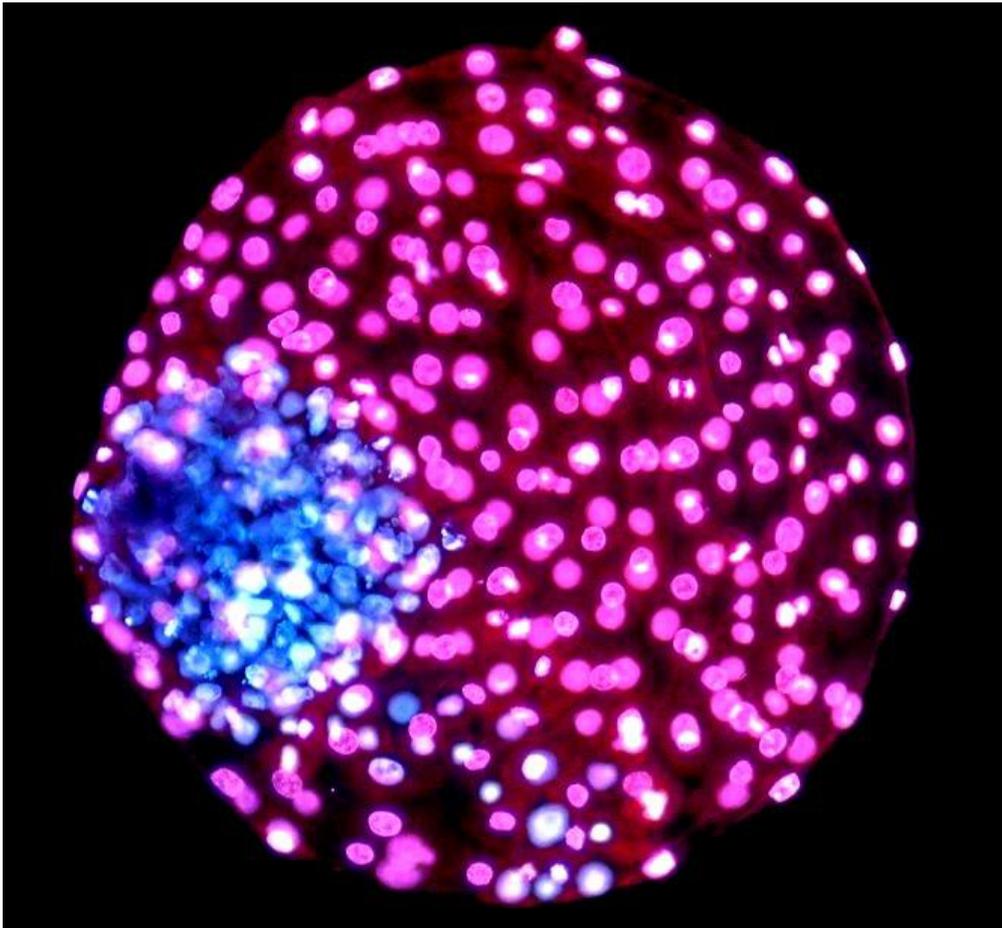


Fig. 13: Colorazione differenziale della blastocisti mostrata nella figura precedente. Si notino le mitosi multiple chiaramente visibili nelle cellule di trofoectoderma. Procedura semplificata di doppia colorazione di Thouas et al. (2001): invece dell'immunolisi, è stato utilizzato un detergente per permeare le membrane delle cellule trofoectodermiche.

Come si è visto anche per i metodi di vitrificazione, l'invenzione del sistema WOW ha stimolato gli embriologi a trovare soluzioni tecniche alternative per realizzare i micro-pozzetti. Per più di dieci anni, la mancanza di un prodotto industriale ha portato alla creazione di diversi prodotti fatti in casa, senza vantaggi sostanziali rispetto al sistema WOW originale.

Per un'applicazione commerciale su larga scala, all'uso delle asticelle metalliche usate nella preparazione meccanica dei WOW è stato necessario sostituire lo stampaggio di piastre in polistirene. Il compito è più impegnativo di quanto inizialmente previsto, dato che richiede strumenti di precisione e considerevoli investimenti commerciali.

### **Micro-pozzetti per sistemi time-lapse**

Improvvisamente, l'introduzione delle macchine time-lapse di nuova generazione adatte all'uso clinico nei laboratori di PMA ha aumentato la richiesta di monitoraggio dello sviluppo di singoli embrioni. Sono stati sviluppati e messi in commercio analoghi del sistema WOW, tra cui le piastre Primo Vision (Cryo-Innovation Ltd, Ungheria; in seguito: Vitrolife, Svezia) e quelle Embryoscope, notevolmente diverse (Unisense, Danimarca; in seguito: Vitrolife, Svezia). A seguire, in tutto il mondo sono stati sviluppati prodotti simili per diversi sistemi time-lapse.

La caratteristica comune di questi micro-pozzetti è che sono stati prodotti per ottimizzare la visibilità ottica e la maneggevolezza, ma hanno compromesso l'obiettivo originale, cioè fornire un ambiente ottimale per lo sviluppo degli embrioni. La loro base è piatta e il loro volume è molto maggiore (vedi Fig. 1 in: Vajta et al., 2021; per l'accesso libero: <https://rdcu.be/ciQik>). Sebbene i tassi di sviluppo in queste piastre possano essere identici, o anche migliori, di quelli ottenuti in goccia, i dati devono essere interpretati con cautela, poiché potrebbero non riflettere le reali potenzialità e i limiti del sistema WOW originale.

### **Le dimensioni contano**

Dal punto di vista dell'embrione, i pozzetti più piccoli sembrano essere migliori. Per un singolo embrione sembra essere sufficiente un pozzetto di diametro leggermente superiore a quello della zona pellucida. La forma del fondo dovrebbe essere arrotondata per ridurre al minimo la quantità di soluzione che circonda l'embrione. Quindi la forma ottimale dovrebbe essere una semisfera con pareti rettilinee verticali leggermente divergenti, una sorta di forma a pan di zucchero rovesciato. Le misure devono essere adattate alle dimensioni dell'embrione di una determinata specie, il che significa che sono quasi identiche per gli embrioni umani, bovini, ovini e suini, e notevolmente più piccole per il topo.

Secondo i calcoli di Matsuura (2014), esiste una differenza di circa due o tre volte nella concentrazione di micro- e macromolecole nel WOW, che consente la diluizione dei materiali di scarto e la concentrazione di fattori autocrini attorno all'embrione. Questa differenza è maggiore nei pozzetti piccoli, il che spiega il migliore sviluppo embrionale osservato in essi. Per ragioni pratiche, tuttavia, esiste un limite alla riduzione del diametro dei WOW.

### **WOW per la valutazione non invasiva degli embrioni**

La coltura di embrioni in WOW offre un vantaggio unico per la valutazione non invasiva preimpianto basata sull'analisi dei terreni di coltura per mezzo di metodologie diverse che comprendono la genetica, il metabolismo e l'analisi del secretoma. A differenza dell'uso nei sistemi time-lapse, non è necessario modificare la forma e le dimensioni: i WOW originali che mantengono lo sviluppo degli embrioni sono ottimali anche per la raccolta del terreno. Le molecole da rilevare sono presenti in alta concentrazione, rendendo il rilevamento e l'analisi più facili e accurati.

### **Lavorare in laboratorio con i WOW**

Nonostante alcune preoccupazioni, le piastre WOW pronte all'uso (Fig. 14) non richiedono maggiore tempo o sforzo nel lavoro quotidiano rispetto alle colture in goccia. Al contrario, con la pratica e seguendo alcuni consigli, il processo può essere ancora più facile e produttivo.

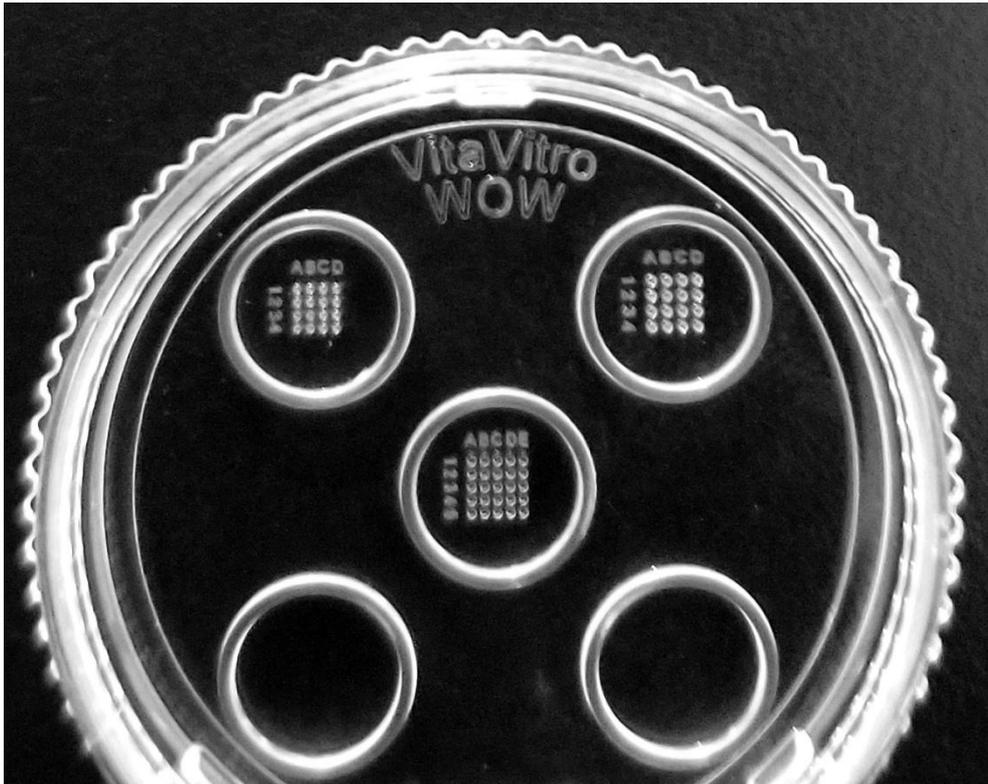


Fig. 14: La piastra WOW VitaVitro. Gruppo centrale: grandi micro-pozzetti a fondo piatto per il time-lapse. Gruppo in alto a sinistra: micro-pozzetti piccoli con fondo stonato come nel sistema WOW originale, per la coltura embrionale. Gruppo in alto a destra: micro-pozzetti piccoli a fondo piatto, un'opzione per il follow-up in time-lapse con migliori condizioni di coltura. Anelli in basso: gocce per il lavaggio degli embrioni e per la valutazione

Il caricamento di singoli embrioni nei micro-pozzetti non rappresenta un problema, soprattutto per gli esperti di golf. Con pozzetti, terreno di coltura e strato d'olio appropriati, anche lo spostamento della piastra WOW da e verso l'incubatore non richiede maggiori accortezze rispetto a quella con le gocce. La rimozione degli embrioni dai WOW deve essere fatta con attenzione, anche se la zona pellucida fornisce un'eccellente protezione da qualsiasi possibile danno. Si raccomanda di non aspirare direttamente gli embrioni dai pozzetti, ma di spingerli fuori dal pozzetto senza toccarli, procurando un leggero flusso di terreno con la punta della pipetta rivolta verso il lato del pozzetto stesso.

Quando si preparano le piastre WOW ready-to-use, è facile che gli embriologi si trovino ad avere a fare con il loro nemico storico che da sempre ostacola nel pipettare, rimescola i mezzi, disturba i micro-canali e inficia il lavoro quotidiano: le bolle d'aria. I produttori di piastre pronte all'uso suggeriscono varie soluzioni per prevenire il problema, tra cui preriscaldare il terreno di coltura e la piastra prima della preparazione, trattare il terreno sottovuoto, rimuovere meccanicamente le bolle picchiando la piastra sul piano di lavoro, allontanandole con un'asticella di vetro e aspirandole con un micro-capillare. Tuttavia, nessuno di questi metodi garantisce che non si formino ulteriori bolle in seguito.

In base alla nostra esperienza, il rivestimento della superficie delle WOWs VitaVitro con un materiale unico e non tossico e l'uso di un terreno di coltura *pre-riscaldato* sulle piastre anch'esse *pre-riscaldate* è il modo più efficiente ed affidabile per eliminare il fastidioso problema delle bolle.

Comunque, i WOW preparati manualmente rimangono un'alternativa poco costosa. Le aste metalliche disponibili in commercio (Fig. 15) devono essere premute saldamente sul fondo di una piastra di coltura

preriscaldata riempita di terreno di coltura e ricoperta di olio. Per evitare crepe il fondo della piastra deve essere sostenuto direttamente con un piccolo pezzo di vetro.



Fig. 15 a e b: per la preparazione artigianale dei WOW sono disponibili asticelle metalliche appositamente progettate. L'uso del tipo stretto offre minore visibilità ma un risultato migliore. *Gli autori dichiarano di non avere alcun interesse commerciale.*

#### 4. FORTE!!

Meglio un "ops!" che un "e se..."  
Beau Taplin

Per scelta personale, in questo capitolo ci occuperemo solo di gameti femminili ed embrioni (di genere misto) ed esclusivamente di vitrificazione.

#### Cos'è la vitrificazione e perché ci piace?

*Vitrificazione* è una delle parole più usate in embriologia e la più fraintesa. Per dimostrare questa affermazione, permettetemi di citare alcune frasi tratte dalle *homepage* di rinomate cliniche di PMA in tutto il mondo:

*"La vitrificazione è una procedura di congelamento di ovociti ed embrioni a tassi elevatissimi di raffreddamento"*. Sbagliato

*"È una procedura molto più complessa dei precedenti metodi di congelamento lento"*. Sbagliato!

*"La vitrificazione sospende il materiale congelato in una struttura reticolare cristallina"*. Come? Cosa???

*"Permette di convertire una struttura cristallina in una molto omogenea"*. Davvero?

*"Questo processo trasforma in uno stato quasi solido, come il vetro"*. Dunque, il vetro è quasi solido? Quasi?

*"La vitrificazione è un metodo di congelamento recente, più rapido e che utilizza volumi più piccoli"* Tutto qui?

E si tratta di cliniche importanti e siti web molto visitati. E il resto?

Quindi, per favore, torniamo alle basi e troviamo una definizione semplice ma scientificamente valida. Tutti noi, a circa dieci anni, abbiamo appreso a scuola che esistono quattro fasi o stati della materia: solido, liquido, gassoso e plasma. Gli esseri umani vivono tra le prime tre fasi e sperimentano solo brevemente la fase di plasma in occasione di un fulmine o (in situazioni molto sfortunate) dell'esplosione di una bomba nucleare. Il passaggio da una fase all'altra dipende da vari fattori, soprattutto la temperatura, ma anche la pressione, la composizione chimica e strutturale, tra gli altri.

La crioconservazione nella biologia riproduttiva dei mammiferi riguarda strutture la cui componente principale è l'acqua. L'obiettivo è quello di abbassare la temperatura a un livello (intorno o al di sotto di  $-150^{\circ}\text{C}$ ) in cui l'attività biologica (compresi i processi distruttivi) è ridotta a zero. Questo processo di raffreddamento può richiedere una transizione di fase da liquido a solido ed è comunemente realizzata con un riarrangiamento strutturale dell'acqua: la formazione di cristalli di ghiaccio, cioè il congelamento (*freezing*). Purtroppo, i cristalli di ghiaccio sono dannosi per le strutture biologiche, rompono le membrane, distruggono i complessi organelli cellulari e uccidono cellule, organi o organismi. Sebbene alcune piante e animali abbiano sviluppato alcuni meccanismi protettivi formando proteine antigelo per prevenire la formazione di cristalli di ghiaccio, l'efficacia di questa protezione è molto limitata e non può essere applicata a temperature estremamente basse.

Fortunatamente, esiste un altro modo per solidificare l'acqua e le strutture cellulari a basse temperature. Il processo si chiama vitrificazione. Il nome fa riferimento al vetro e, in effetti, è lo stesso fenomeno che si verifica nella produzione del vetro a partire dal biossido di silicio, la cui forma cristallina è la comune sabbia. Quindi, tutti i nostri oggetti di vetro, bottiglie, finestre e tazze sono il risultato della vitrificazione. Un altro esempio tipico è lo zucchero filato (zucchero vitrificato), un tempo molto amato, rispetto alle caramelle solide. Persino la comune stiratura dei tessuti comporta una sorta di transizione delle fibre in stato vetroso. Anche la produzione di porcellana è il risultato della vitrificazione, che avviene riscaldando il caolino a temperature superiori a  $1200^{\circ}\text{C}$  prima del raffreddamento.

In generale, la transizione allo stato vetroso richiede condizioni particolari che variano notevolmente a seconda del materiale. Gli scienziati non hanno ancora capito bene perché avviene, ma la maggior parte concorda sul fatto che non si tratta di una vera e propria transizione di fase/stato. Si tratta piuttosto di un *aumento estremo della viscosità di una soluzione*. Immaginate: tutte le molecole di un liquido smettono di

muoversi e, senza alcuna ristrutturazione, rimangono al loro posto. Di conseguenza, l'acqua vitrificata non è acqua congelata e non può essere scongelata. Nel caso della vitrificazione in embriologia, i termini corretti sono *cooling* (raffreddamento) e *warming* (riscaldamento); e con gli embrioni vitrificati si effettuano i transfer di embrioni crioconservati (anziché congelati) (Shaw e Jones, 2002), anche se queste regole ragionevoli sono oggi dimenticate anche dai professionisti.

Per indurre la vitrificazione nell'acqua e mantenerla durante l'intero processo di crioconservazione, compreso il *warming*, sono necessarie condizioni estreme, tra cui

- velocità di raffreddamento (*cooling rate*) e riscaldamento (*warming rate*) molto elevate. Una spiegazione comune è non lasciare il tempo perché il ghiaccio si formi. Non siamo certi che questa spiegazione (apparentemente plausibile) sia del tutto corretta ma, per un biologo della riproduzione, il "perché" è meno importante del "come" (vedi più avanti). Fortunatamente, anche in un comune laboratorio di embrioni, esistono modi relativamente semplici per raggiungere velocità tra 15.000 e 20.000 °C/min sia per il raffreddamento che per il riscaldamento. Tuttavia, anche questa condizione non sarebbe sufficiente per vitrificare l'acqua pura. Abbiamo bisogno di ulteriori strategie. (Si noti, tra parentesi, che alcuni scienziati e aziende suggeriscono che il *cooling rate* sia meno importante del *warming rate*. Tuttavia, poiché le loro prove sono piuttosto limitate e l'esperienza generale non supporta questa tesi, preferiamo dire che entrambe le velocità, di raffreddamento e di riscaldamento, sono molto importanti).

- Un altro modo per favorire la vitrificazione è quello di *aumentare la pressione*, ma raggiungere i livelli estremi di pressione necessari è del tutto impossibile mentre si lavora con i campioni. Quindi, questa alternativa è una strada non percorribile.

- Abbiamo bisogno di *aggiungere crioprotettori*. Tali sostanze chimiche e/o additivi organici impediscono la formazione di ghiaccio e proteggono le cellule mediante due diversi meccanismi: 1) per effetto osmotico: estraggono l'acqua intracellulare, aumentando la concentrazione di molecole organiche e ostacolando la formazione di ghiaccio nella cellula; 2) entrando nelle cellule e/o legandosi alla membrana plasmatica e proteggendo le strutture dai danni causati dal ghiaccio (*cryo-damage*). Anche in questo caso, i meccanismi non sono del tutto compresi ma funzionano.

- Occorre anche *diminuire il volume della soluzione* per evitare il congelamento (*freezing*) accidentale, noto come nucleazione del ghiaccio, che è più probabile che avvenga in grandi volumi. Fortunatamente, il volume ridotto è una strategia utile ad ottenere alti tassi di raffreddamento e riscaldamento. Un colpo di fortuna<sup>8</sup>.

- Per soddisfare tutti i requisiti sopra elencati, dobbiamo stabilire un metodo altamente standardizzato che garantisca un processo efficiente e non dannoso, facile da apprendere e da ripetere con risultati adeguati e consistenti.

*(Una riflessione personale di GV)*

*Trenta anni fa, quando ho iniziato a lavorare nel campo dell'embriologia, la vitrificazione era ancora una nuova tecnologia emergente, quasi una curiosità. Purtroppo (o per fortuna?), le nostre blastocisti bovine ottenute con FIV non sopravvivevano alla tradizionale procedura di congelamento lento. Disperati, abbiamo iniziato a fare alcune prove di vitrificazione utilizzando il metodo (allora) all'avanguardia del mio amico Kazuhiro Saeki, di Hokkaido, in Giappone. Lavoravamo con paillettes da inseminazione standard da 0,25ml, velocità di raffreddamento relativamente basse (era necessario un raffreddamento graduale in fase di vapore per evitare la rottura delle paillettes sigillate mentre, per evitare l'esplosione al momento del riscaldamento, erano sufficienti alcuni secondi in aria prima dell'immersione in acqua) e circa il 60% in più di*

---

<sup>8</sup> La nostra fortuna non si ferma qui. Stabilendo condizioni adeguate alla vitrificazione, possiamo evitare altre due tipologie di problemi comuni nel congelamento lento tradizionale: la rottura e la lesione da congelamento, come si vedrà più avanti.

*crioprotettori. Abbiamo ottenuto una sopravvivenza più o meno adeguata, e persino gravidanze. Era un buon risultato, ma non ancora ottimale.*

*Poi, nel 1997, abbiamo tenuto una conferenza a Nizza, in Francia, con la meravigliosa atmosfera mediterranea, la città affascinante e il mare bellissimo. Purtroppo, rimasi bloccato in un affollato workshop serale sulla vitrificazione. Vecchi saggi analizzavano le ragioni degli insuccessi, elencando all'infinito vicoli ciechi e fallimenti. Mi annoiavo, volevo scappare, andare in spiaggia, bere una birra, ma non riuscivo nemmeno a raggiungere la porta. Per reprimere la rabbia, presi un foglio di carta e cercai di trovare una soluzione al problema che i grandi scienziati non erano in grado di risolvere.*

*Sono tornato in Danimarca in una serata fredda e ventosa. Sono andato subito nel laboratorio vuoto e ho cercato di produrre lo strumento secondo il mio schizzo. Il giorno seguente ho fatto alcune prove preliminari su embrioni di bovino. Ha funzionato benissimo. In poche ore ho scoperto anche alcuni vantaggi meno evidenti di questa nuova applicazione, tra cui l'estrema facilità nel caricamento, nel warming e nell'espulsione. In poche settimane, ho perfezionato il metodo, aggiustato alcuni parametri e chiesto al mio amico giapponese di misurare i tassi di raffreddamento. Mi ha inviato i risultati con le sue congratulazioni: il risultato era migliore del previsto, da 16.000 a 25.000°C/min. In tre mesi, avevo dati sufficienti per un articolo che ad oggi è stato citato più di 1.200 volte. È diventato una delle pubblicazioni più citate sulla crioconservazione degli embrioni di mammifero (Vajta et al., 1998).*

*Questa è la storia della nascita del primo strumento appositamente realizzato per la vitrificazione: l'Open Pulled Straw (OPS; Fig. 16). Potete capire perché mi piace. Nei 3-4 anni successivi, ho vitrificato con successo praticamente tutto ciò che fosse disponibile relativamente all'embriologia sugli animali d'allevamento. L'OPS è stato anche usato per ottenere grandi risultati sull'uomo, tra cui il primo bambino nato dalla vitrificazione di ovociti e zigoti umani, e come l'approccio più efficiente per la crioconservazione di cellule staminali embrionali umane (Kuleshova et al., 1999; Selman e El-Danasouri, 2002; Reubinoff et al., 2001).*

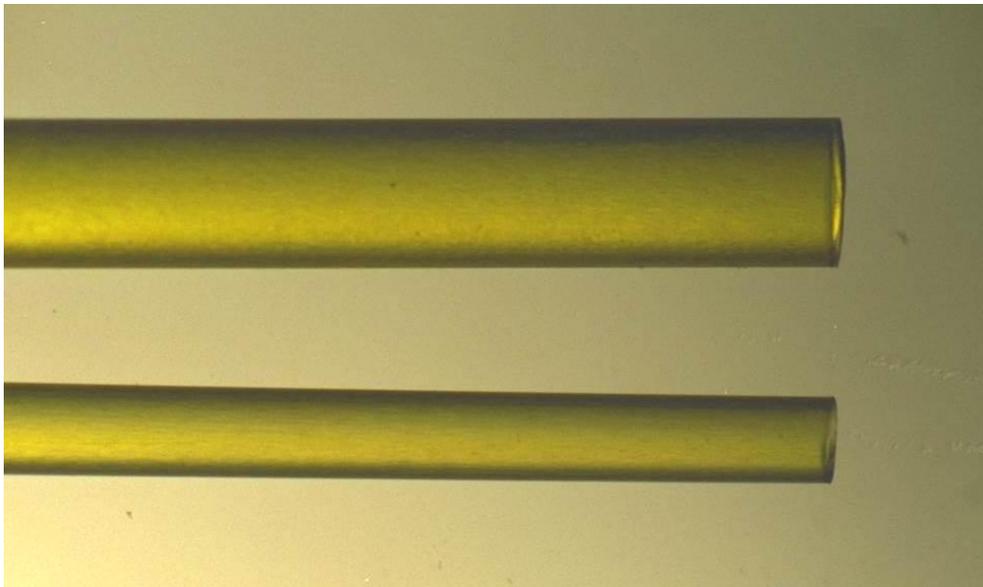


Fig. 16: La differenza tra una paillette da inseminazione standard da 0,25 ml e l'OPS. Dimezzando il diametro si ottengono tassi di *cooling* e *warming* dieci volte superiori e >1.200 citazioni.

E tornando alla domanda iniziale: perché amiamo la vitrificazione?

Perché è un miracolo. Rende possibile l'impossibile - fermare e riavviare l'inarrestabile: la vita umana<sup>9</sup>. Perché è una miscela fantastica e unica, basata su una procedura manuale antiquata che ricorda le tecniche dei nostri predecessori di 100-150 anni fa, per ottenere risultati da 21° secolo. Lavorando con la vitrificazione, diventi un pioniere nelle valli della California o un minatore cinese nei ricchi giacimenti d'oro dell'Australia, e allo stesso tempo, protagonista di uno dei progetti più entusiasmanti del nostro secolo.

### **Dispositivi e velocità di raffreddamento e riscaldamento**

Come accennato precedentemente, gli esperimenti iniziali di vitrificazione sono stati eseguiti nei supporti classici usati per la crioconservazione da 0,25 ml, ovvero le *paillettes in plastica da inseminazione*, oppure nelle *cryovials*. Questi strumenti non erano stati progettati per la vitrificazione e, a causa del loro grande diametro, richiedevano una quantità relativamente elevata di soluzione per un caricamento sicuro (5-7 µl per le *paillettes* e 10+ µl per le *cryovials*). Di conseguenza, e anche a causa dello spessore delle loro pareti, le velocità di raffreddamento e riscaldamento teoricamente raggiungibili erano piuttosto limitate (circa 2000°C/min per le *paillettes* e molto meno per le *cryovials* - fortunatamente questi ultimi supporti sono stati presto dimenticati). Per evitare la rottura o l'esplosione delle *paillettes*, si usava eseguire il raffreddamento e il riscaldamento in due fasi; queste manipolazioni, tuttavia, aggiungevano ulteriore inconsistenza alla procedura. Inoltre, la solidificazione non omogenea di questi grandi volumi creava variazioni di pressione tali da provocare la spaccatura del mezzo vitrificato e la rottura del campione all'interno. Quindi, invece di risolvere il problema dell'inefficienza del congelamento classico, si mantenevano gran parte degli svantaggi e se ne aggiungevano altri. Ovviamente, erano necessari nuovi dispositivi.

Grazie alla favolosa creatività degli embriologi dei mammiferi, per più di dieci anni non è successo nulla. Quasi tutti gli "esperti" hanno accettato questi limiti e svantaggi<sup>10</sup>.

Naturalmente, c'erano stati alcuni tentativi preliminari. Ad esempio, *far cadere gli embrioni direttamente (senza alcuno strumento di supporto) nell'azoto liquido* (Landa e Tepla, 1990). Ottima idea, peccato non funzioni (il primo tentativo dovrebbe dimostrarlo). Per formare una goccia dalla soluzione concentrata di vitrificazione, sono necessari almeno 5 µl, una quantità troppo grande per poter ottenere una velocità di raffreddamento adeguata. Inoltre, una volta che la goccia tocca la superficie dell'azoto liquido, inizia a galleggiare e a compiere bizzarre evoluzioni sulla superficie per diversi (piuttosto lunghi) secondi. Il motivo è molto semplice: l'azoto liquido è vicino al punto di evaporazione, -196°C. Tutto ciò che è più caldo (come la nostra goccia contenente il campione) induce un'ampia evaporazione, e lo strato di vapore che si crea funge da termoisolante, impedendo alla goccia di affondare<sup>11</sup>. Il risultato è una scarsa velocità di raffreddamento che non può nemmeno essere misurata correttamente.

Ebbene, i lavori basati su questo "tre volte inadeguato" metodo sono stati pubblicati ripetutamente per dieci lunghi anni.

Un altro approccio è stato il *metodo delle gocce di volume minimo* (Arav, 1992), un'idea con un grande potenziale per il futuro. Purtroppo, richiedeva costosi crio-microscopi e non poteva essere utilizzato nella pratica quotidiana.

Alla fine, il primo metodo che ha sfruttato appieno l'enorme potenziale dell'approccio "minimo volume-contatto diretto" è stato l'impiego, come supporto, della *griglia di rame usata per la microscopia elettronica* (Steponkus et al., 1990, su *Drosophila melanogaster*; Martino et al., 1996, sul bovino). In effetti, fino a questo momento, era stata una delle strategie migliori: la quantità di soluzione era ridotta (anche se

---

<sup>9</sup>Per i lettori più sensibili suggeriamo di leggerlo come "sviluppo umano".

<sup>10</sup>Devo riconoscere che anch'io ho avuto un ruolo significativo in questa mancanza, per sette lunghi anni (ammissione di GV)

<sup>11</sup>Una versione dell'effetto Leidenfrost (preziosa osservazione di Deepa Sekhar)

standardizzazione e uniformità erano un problema), il metallo termoconduttore aumentava la velocità di raffreddamento e di riscaldamento e la goccia di soluzione, solidificando rapidamente, ancorava con sicurezza il campione sulla superficie. Anche la rimozione del campione, al riscaldamento, era facile e sicura. La piccola griglia metallica ha cambiato le carte in tavola: ha aperto la strada alla riduzione della concentrazione di crioprotettori e a sfruttare il valore pratico dell'approccio del volume minimo e del contatto diretto con l'azoto. Tuttavia, le piccole dimensioni del supporto, la mancanza di un sistema per la corretta identificazione dei campioni e per un pratico stoccaggio ne hanno limitato l'applicazione ai laboratori sperimentali.

Dobbiamo anche comprendere una cosa: gli embriologi preferivano lavorare con le paillettes. Tutto o quasi tutto in un laboratorio di embriologia veniva crioconservato in paillettes, compresi gli embrioni, le blastocisti, lo sperma, gli ovociti (di cui solo una piccola parte sopravviveva alle vecchie procedure). Tutti i dewar e i relativi cestelli erano progettati per lo stoccaggio di paillettes. Non era possibile eliminare l'intera infrastruttura per sfidare un nuovo territorio.

Quindi, volevano le paillettes e noi gliele abbiamo date, con qualche modifica: l'OPS.

I vantaggi erano evidenti. Facili da maneggiare, proprio come una penna. Facili da caricare, con un volume standard predefinito utilizzando una goccia e la capillarità. Nessun attaccamento alle superfici, nessuna deformazione poiché il campione galleggia sempre nella colonna di soluzione. Nessun pericolo di disidratazione e shock osmotico dopo il caricamento: la colonna di soluzione e la paillette lo evitano. Velocità di raffreddamento e riscaldamento tali da consentire, nonostante la struttura relativamente robusta e sicura, basse concentrazioni di crioprotettori ed un'eccellente sopravvivenza di embrioni e ovociti di molte specie di mammiferi, compresi quelli umani. Facile stoccaggio nei classici cestelli e dewar. Semplice espulsione grazie al riscaldamento/espansione dell'aria nella paillette che lentamente spinge fuori la soluzione. Facile e in assenza di stress anche il recupero del campione vitrificato dalla piastra di riscaldamento (Fig. 17).

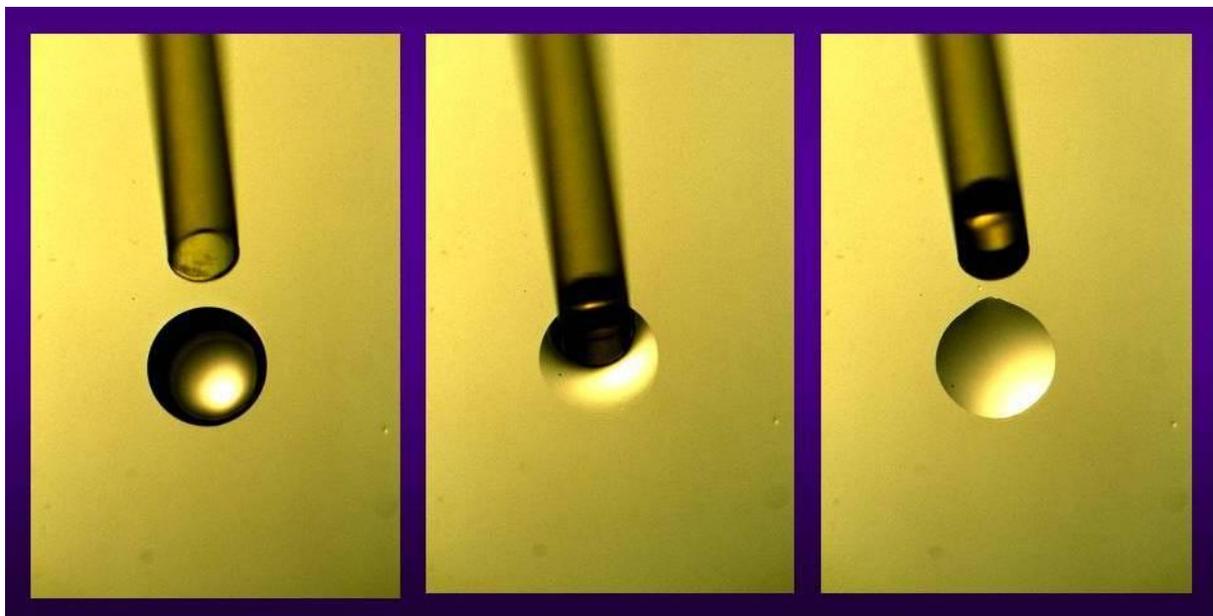


Fig. 17: Il processo di caricamento dell'OPS per effetto capillare. Dimensione della goccia: 1 $\mu$ l.

Secondo pareri diversi, *l'apprendimento e l'uso costante dell'OPS da parte di un embriologo principiante è più facile* di quello di qualsiasi altro metodo di vitrificazione progettato e commercializzato negli ultimi ventidue anni. E, cosa più importante, nessuna delle tecniche introdotte dopo l'OPS ha offerto migliore sopravvivenza, risultati più costanti o una più ampia applicabilità. L'originale è ancora il migliore.

Forse si tratta di pura fortuna, ma è comunque un dato di fatto.

Naturalmente, le alternative esistono. Più di quante si possa immaginare. Secondo alcune stime, oggi esistono almeno cento metodi di vitrificazione. Ci sono stati anni in cui quasi tutti coloro che si occupavano, anche solo marginalmente, di vitrificazione hanno creato il proprio metodo e il relativo supporto. Per non parlare delle numerose varianti personali non pubblicate. L'ideazione era solo una parte del problema; la seconda questione, forse ancora più impegnativa, era come chiamarla. I termini "Cryo" e "Vitri" erano decisamente abusati, con variazioni del finale, *leaves, tops, locks, tips, safes, ingas*, ecc. ecc. Sono state anche introdotte divertenti modifiche dell'OPS, che consistevano in micro-pipette in vetro (si noti che in molti paesi è illegale usare il vetro per la crioconservazione!), puntali per il caricamento di gel, *closed-pulled straws*, pipette per la decumulazione, puntali per pipettatrici, solo per citarne alcuni.

Chi ha vinto?

Se pensiamo alla *quantità*, i vincitori sono quelli che hanno avuto il maggiore sostegno finanziario. Hanno avuto i soldi per i brevetti, gli accreditamenti, la pubblicità, il marketing e per difendere legalmente le loro affermazioni, a volte discutibili.

Se consideriamo il *riconoscimento scientifico*, il quadro è diverso. L'OPS è stato ampiamente utilizzato in embriologia sul bestiame e per scopi sperimentali. Quasi tutti gli animali clonati del mondo nati da embrioni crioconservati sono stati vitrificati con il metodo OPS (attenzione: gli embrioni clonati sono incredibilmente fragili e sensibili a qualsiasi intervento). Come già accennato, con il metodo OPS è nato il primo bambino da vitrificazione di ovociti (un approccio che ha poi cambiato l'intero mondo della PMA), ed è ancora il metodo più efficace per la vitrificazione di cellule staminali embrionali umane.

*La commercializzazione dell'OPS è stata ritardata.*

*Io (GV) non sono un uomo d'affari e, fino a poco tempo fa, non sono stato fortunato nei miei tentativi di trovare un'azienda che sostenesse le mie innovazioni. Alla fine, però, lo sono stato enormemente. Il gruppo di VitaVitro fornisce tutto ciò che questa tecnologia merita. Fiducia, supporto amministrativo e finanziario, creatività e produzione secondo gli standard più elevati al mondo, ottimo marketing e un'atmosfera amichevole e ottimista.*

L'OPS è ora un prodotto VitaVitro che ha già ottenuto le certificazioni FDA e CE. Inoltre, è stato autorizzato dalla severissima FDA cinese per le vendite nazionali e globali.

### **Soluzioni per la vitrificazione**

Chi è venuto prima, l'uovo o la gallina? A questa antica domanda non possiamo rispondere, ma sappiamo con certezza che la prima crioconservazione di successo è stata effettuata sul pollame. No, non di un uovo, ma di seme. Una storia straordinaria, piuttosto tipica, più che eccezionale, della biologia riproduttiva.

Subito dopo la Seconda guerra mondiale, Christopher Polge, un giovane e ambizioso scienziato inglese, iniziò a lavorare sulla crioconservazione di spermatozoi di pollame, a Londra. Sulla base di alcune ricerche precedenti, aggiunse il fruttosio in varie concentrazioni al terreno di coltura. Riuscì a migliorare la sopravvivenza, ma gli spermatozoi apparentemente vitali non riuscivano a penetrare le uova e non si otteneva alcuna fecondazione. Christopher andò quindi in vacanza.

Al suo ritorno, ricominciò il lavoro usando la sua solita bottiglia sul suo scaffale e fece un altro tentativo. Con sua grande sorpresa, le cose cominciarono a funzionare a meraviglia! Era entusiasta ma anche curioso: perché? Cosa era cambiato? Chiese a tutti, confrontò il contenuto della bottiglia con nuove soluzioni di fruttosio: era diverso, la consistenza, l'effetto solvente, tutto.

Alla fine, la verità venne fuori. Mentre Christopher era in vacanza, al suo banco di lavoro, uno dei suoi colleghi stava svolgendo un lavoro completamente diverso, la valutazione microscopica del seme. La vecchia bottiglia era stata utilizzata per preparare i fissativi per i vetrini. Non conteneva una soluzione di fruttosio ma una miscela di albume d'uovo e di glicerolo, un solvente organico, un tipo di alcol (solo in termini chimici, non bevetelo!).

Si trattava di un eccellente crioprotettore: il defunto Professor Polge riuscì a congelare il seme dei polli e poi quello dei tori, ottenendo progenie in entrambe le specie. Da questa scoperta è nata un'industria, quella dell'inseminazione artificiale, che ha portato a miliardi di capi di bestiame nati da seme congelato. In coltura cellulare e tissutale, in batteriologia e micologia, il glicerolo è ancora il crioprotettore più comunemente utilizzato. Dopo diversi decenni, è rimasto il componente principale delle soluzioni utilizzate per il congelamento classico degli embrioni di animali e persino umani.

Tutto questo è accaduto a causa di uno sciocco errore.

*(Nota di GV): Non posso raccontarvi le volte in cui un evento imprevisto – un blackout elettrico, un guasto a un macchinario, un cattivo tempismo, la pigrizia di tornare in laboratorio a mezzanotte, un errore di calcolo, eccetera – ha portato un problema specifico ad una svolta. Non posso dirvelo perché è successo così tante volte. E non posso dirvelo perché direste che sono il Mr. Bean della scienza).*

Ma, come per il Professor Polge, il risultato è ciò che conta, non la storia. Quindi, vi prego di essere consapevoli dei vostri errori. Verificate cosa succede dopo che torturate i vostri ovociti o embrioni. Forse un risultato migliore. Forse una svolta. Forse quell'esperimento sbagliato determinerà il vostro intero futuro!

Per quanto riguarda le soluzioni, i terreni utilizzati per la crioconservazione hanno diversi componenti essenziali, tra cui

1. un *mezzo base* costituito da una soluzione salina fisiologica e da pochi (5-7) o molti (20-40) componenti, come ad esempio fonti di energia, vitamine, ecc. utilizzati per vari scopi nella coltura dei tessuti e degli embrioni;
2. un *tampone* che, all'aria, aiuta a stabilizzare il pH a un livello fisiologico;
3. *macromolecole* (organiche o inorganiche, a composizione definita, semidefinita o non definita);
4. *crioprotettori*.

1. Sono stati pubblicati pochissimi studi comparativi riguardo all'effetto dei vari mezzi base sull'esito della vitrificazione. La maggior parte degli scienziati li considera semplicemente dei componenti passivi della procedura, come i figuranti in un film o come le ruote in un'auto da corsa. Tuttavia, come le ruote, e soprattutto gli pneumatici, possono avere un ruolo cruciale in alcune situazioni; anche il ruolo dei mezzi non deve essere sottovalutato.

In base alla nostra esperienza, la vitrificazione degli embrioni di bovino può essere effettuata con successo in una semplice soluzione salina di tampone fosfato (PBS). Tuttavia, la maggior parte delle aziende offre un mezzo base più complesso come parte dei loro kit di vitrificazione. Questi terreni sono di solito analoghi ai loro terreni di coltura; solo che il tampone bicarbonato viene sostituito con un altro tampone che può essere usato in assenza di CO<sub>2</sub> (vedi più avanti).

Poiché i terreni per la coltura embrionale sono stati notevolmente semplificati tra la fine degli anni '90 e inizio 2000, anche i mezzi base non sono complessi, soprattutto se confrontati con la prima generazione di terreni di coltura usati solitamente negli anni '80 per gli embrioni e usati ancora oggi in lavori sulle colture di cellule somatiche o tessuti. Gli embrioni di solito non hanno bisogno di una soluzione così complessa. Prima dell'impianto, vivono nell'ovidotto e nella cavità uterina che, per definizione, non è all'interno del corpo umano, ma in un canale aperto verso il mondo esterno, con costituenti molto più semplici nella

soluzione secreta che circonda l'embrione. Ovviamente, ciò che è adatto alla coltura embrionale dovrebbe essere valido anche per la vitrificazione.

Lo è davvero? Le nostre teorie "logiche" non sono sempre applicabili ai processi biologici.

L'embriologia animale offre molta più libertà di sperimentazione. Anche i pionieri della vitrificazione applicata all'uomo avevano molte informazioni utili su questioni importanti che oggi sembrano essere trascurate.

Per quanto riguarda i mezzi base, abbiamo iniziato i nostri esperimenti seguendo la "vecchia scuola" e utilizzando un terreno molto complesso chiamato Tissue Culture Medium 199 (TCM 199). Lo abbiamo poi confrontato con mezzi simili di nuova generazione, con composizione molto più semplice. Dato che non si riscontravano grandi differenze, abbiamo assecondato i cambiamenti in corso e abbiamo iniziato a utilizzare i nuovi mezzi più semplici. Abbiamo conservato questi nuovi mezzi a 4°C, come indicato, per uno, due mesi..., poi i tassi di sopravvivenza hanno iniziato a scendere. Circa alla data di scadenza, o poco prima. Una circostanza che non si era mai verificata con il TCM-199.

Questo risultato non è mai stato pubblicato, ma alle cene dei convegni ancora se ne parla. Lo stesso risultato è stato riportato negli Stati Uniti, in Australia e in Europa. Così siamo lentamente tornati al TCM-199.

2. Lo stesso è accaduto con il buon vecchio *tampone* Hepes. Molte aziende offrono alternative; la più popolare è il MOPS. Tuttavia, qualsiasi composizione, ad eccezione del TCM-199 tamponato con HEPES, può avere effetti negativi dopo qualche mese di conservazione. Forse dopo la data di scadenza, ma poco dopo. Al contrario, il TCM-199 tamponato con Hepes ha un margine più ampio, mantiene la sua stabilità a lungo ed è affidabile.

*"Ogni zingaro loda il proprio cavallo"* - un proverbio ungherese, la nostra prima madrepatria.

Sì. Il mezzo base e il tampone di VitaVitro sono rispettivamente TCM-199 e Hepes. Inoltre, cosa specifica dei mezzi VitaVitro, abbiamo aggiunto alcuni composti extra al nostro TCM-199 per facilitare la vita ad ovociti ed embrioni durante questa procedura estremamente impegnativa.

3. Le *macromolecole* non sono parti essenziali delle soluzioni utilizzate per la crioconservazione, ma il loro uso è fortemente consigliato. Il loro effetto è complesso da descrivere: in generale, proteggono i campioni e migliorano la sopravvivenza e i successivi tassi di sviluppo. Parte di questo effetto è legato al loro contributo al mantenimento della pressione osmotica, che consente l'uso di concentrazioni inferiori di crioprotettori non permeabili e permeabili (vedi sotto). Inoltre, contribuiscono all'aumento della viscosità della soluzione attenuando così lo stress meccanico durante il processo. Le macromolecole impediscono l'attaccamento di ovociti ed embrioni alle superfici di plastica e vetro e possono anche proteggere la membrana cellulare formando un semplice rivestimento o legami specifici.

Una "tradizione" cinquantennale in embriologia è quella di cercare di utilizzare, in tutti i terreni di coltura, per tutti i processi, composti chimici definiti al fine di aumentare l'efficacia e diminuire il rischio di contaminazione. Fino ad oggi, nonostante i ripetuti tentativi, gran parte di questi sforzi è fallita. Tra gli altri, sono stati riportati successi promettenti con il polietilenglicole (PEG), il polivinilpirrolidone (PVP) e il Ficoll. Tuttavia, studi comparativi indipendenti hanno rilevato come questi materiali siano meno efficienti delle proteine.

Di recente è stata introdotta ed utilizzata nei mezzi commerciali l'idrossipropil-metilcellulosa (HPMC). Questo materiale è prodotto da una drastica modificazione chimica della cellulosa. Viene utilizzata sia per scopi medici (compresi i trattamenti topici per gli occhi e per il rivestimento di farmaci) sia come sostituto

del glutine nel pane senza glutine. Non viene assorbita dal tratto digestivo; di conseguenza, è considerata non tossica dalle autorità.

Nonostante ciò, l'HPMC può indurre reazioni allergiche se usata come trattamento oftalmico e può anche creare problemi gastrointestinali, simili a quelli che le persone sensibili al glutine si aspettano di eliminare. A causa 1. della concentrazione relativamente elevata nel mezzo di vitrificazione; 2. dei meccanismi di protezione quasi paralizzati nei campioni vitrificati, soprattutto dopo il warming; e 3. della mancanza di una barriera (come la parete intestinale) che protegge ovociti ed embrioni in vitro, l'uso dell'HPMC, nonostante alcuni lavori a sostegno, dovrebbe richiedere una certa cautela.

Le macromolecole più comunemente utilizzate nei terreni di coltura per la FIV sono le proteine derivate dal siero o dal plasma umano. Sono disponibili diversi prodotti, tra i più comuni vi sono l'albumina sierica umana (HSA), il supplemento sostitutivo del siero (SSS) con globulina e lipoproteina come componenti extra e additivi simili di vari produttori nel mondo. In precedenza, anche il siero umano era nella lista, ma è stato presto rimosso a causa dei frequenti problemi di tossicità e di potenziale contaminazione. In molti Paesi, le normative nell'ambito della riproduzione limitano l'uso di alcuni di questi additivi. Fortunatamente, a differenza degli embrioni bovini, nell'uomo l'albumina sierica, solitamente non soggetta a restrizioni, è perfettamente adatta alla vitrificazione.

Le *proteine anti-freezing* sono difficili da classificare. Sono sia macromolecole che crioprotettori. Come già detto, sono prodotte da organismi che vivono in ambienti ostili e che devono sopravvivere per lunghi periodi, di solito di inattività, a temperature sotto 0°C. Fino a un certo punto queste proteine possono impedire la formazione di cristalli di ghiaccio. In casi fortunati, una differenza di pochi gradi nel punto di congelamento è sufficiente a garantire la sopravvivenza.

Classificare queste proteine potrebbe non essere necessario; esse stesse potrebbero non essere necessarie nei mezzi di vitrificazione. Negli ultimi 30 anni, l'uso delle proteine anticongelamento è apparso e scomparso ripetutamente dopo poche pubblicazioni. Forse troveranno una possibile applicazione nei futuri protocolli di crioconservazione di qualche vertebrato, ma probabilmente non nel corso della nostra (anzi vostra) vita e nella nostra specie.

4. I *crioprotettori* sono i composti più importanti e (quasi) del tutto indispensabili dei mezzi di vitrificazione. È necessario aggiungere la parola "quasi" poiché i gameti maschili, con la loro struttura estremamente compatta e il basso contenuto d'acqua, possono offrire qualche possibilità di vitrificazione senza crioprotettori.

Tuttavia, per gli ovociti e per tutti gli embrioni, dagli zigoti alle blastocisti ad ogni stadio, i crioprotettori sono assolutamente necessari. Questi composti possono essere permeabili o non permeabili. Non si tratta solo di un (inutile) sofisma "accademico", ma di un diverso ruolo, anche se leggermente sovrapponibile.

Il compito dei crioprotettori non permeabili è quello di far fuoriuscire l'acqua dalla cellula prima del raffreddamento, in modo rapido e deciso, con l'aiuto di una concentrazione molto elevata di crioprotettori permeabili (vedi sotto), semplicemente prima che questi abbiano il tempo di entrare nelle cellule. Un altro ruolo dei crioprotettori non permeabili si ha allo scongelamento ed è quello di proteggere le cellule dalla rottura, quando i crioprotettori permeabili sono ancora all'interno di esse ma assenti nella soluzione circostante. Quindi, quelli non permeabili non hanno altra funzione che quella di comprimere e mantenere compresse le cellule; l'unico requisito necessario è che non siano tossici. Da questo punto di vista, il saccarosio, lo zucchero più semplice che beviamo con il caffè, il tè e la non diet-Coke, è un'ottima scelta.

*(Altra storia personale di GV. Uno dei momenti più entusiasmanti della mia vita, altrimenti estremamente noiosa, è stata una telefonata da un paese lontano. Tutto era pronto per il mio amico embriologo in visita lì, l'embrione in azoto liquido, il medico in sala operatoria, la paziente pronta, ma il saccarosio non era stato ancora consegnato dal distributore. La mia unica domanda è stata: "C'è una caffetteria al piano di sotto?"*

*Allora scendi, prendi delle zollette di zucchero, misura, sciogli, aggiungi, filtra"... dopo un mese ho avuto la notizia: la signora era incinta).*

Ovviamente è uno scherzo!!! (oppure no?)

È solo saccarosio comune, nient'altro. Una versione più chic è il trealosio, un altro zucchero, che ha zero benefici aggiuntivi; solo il prezzo è molto più alto. Comunque, c'è chi preferisce una Aston Martin<sup>12</sup>.

Restiamo in tema; anche l'altro gruppo, quello dei crioprotettori permeabili, è legato alle automobili. I solventi organici sono eccellenti come agenti crioprotettori, compreso il leggendario glicerolo. Ma anche altri - tra cui il più convenzionale etanolo - sono stati utilizzati con successo allo stesso scopo. Alcuni laboratori - compresi alcuni di fama mondiale - sono paranoici sull'uso di etanolo spray, anche solo per decontaminare le superfici. Probabilmente non sanno che gli embrioni possono tollerare l'esposizione fino al 10% di alcol per diversi minuti e che questo può addirittura stimolare il loro sviluppo. Nessun essere umano, nemmeno un australiano, sopravviverebbe a un decimo di questa concentrazione nel sangue...

Ma, parlando di automobili, il glicole etilenico (EG), il crioprotettore meno tossico, più efficiente e affidabile per la vitrificazione, è anche il componente più importante del liquido di raffreddamento per auto. Il meccanismo d'azione è lo stesso: prevenire la formazione di ghiaccio. Siamo stati fortunati. La soluzione era nel nostro garage.

Purtroppo, l'uso del solo EG non è la strategia migliore. Tutti i crioprotettori permeabili hanno un certo effetto tossico che varia da un crioprotettore all'altro. Ma se ne usiamo due, la tossicità specifica si dimezza e l'effetto crioprotettivo rimane lo stesso o addirittura migliora.

Sì, ma quale dovrebbe essere il secondo crioprotettore permeabile? Qui il dibattito tra laboratori e produttori diventa aspro; c'è una lotta all'ultimo sangue e oltre. Esistono diversi candidati ma i due concorrenti in testa sono il glicole propilenico e il dimetilsolfossido (DMSO).

In realtà, il DMSO è stato solo sfortunato. È un eccellente crioprotettore ed è anche un ottimo solvente, con un effetto meno tossico di tutti gli altri concorrenti. Come ottimo solvente è stato usato per sciogliere sospetti agenti cancerogeni usati sperimentalmente sugli animali. Funzionava bene ma talmente bene che diminuiva l'effetto cancerogeno del composto testato. Così venne accantonato.

Molti scienziati hanno sentito solo una parte della storia e hanno collegato il DMSO alla cancerogenesi. La situazione è paragonabile a quella di un uomo che sarebbe stato "coinvolto in un caso di rapina". Sì, era coinvolto. È stato derubato...

Molti gruppi e produttori si fidano ancora del DMSO e si oppongono agli annunci di chi pubblicizza come "non tossica" l'alternativa (il glicole propilenico), che in realtà lo è, addirittura è un ordine di grandezza più tossico rispetto al DMSO e, cosa ancora più importante, è meno efficace.

Quando io (GV) ero un embriologo di bovini in Danimarca, ho avuto il raro privilegio di vitrificare (letteralmente) decine di migliaia di ovociti ed embrioni. Ho sfruttato questa opportunità per testare molte possibili combinazioni di questi crioprotettori (25-75%, 33-67%, su e giù, ecc.). Alla fine, la proporzione ottimale di EG e DMSO sia nella soluzione diluita che in quella concentrata era 50-50%. Esattamente le stesse proporzioni con cui avevamo iniziato.

*Dunque, abbiamo la squadra. TCM-199 tamponato con Hepes, albumina sierica umana, saccarosio, glicole etilenico, DMSO e, ovviamente, l'OPS (Fig. 18). Che il gioco abbia inizio!*

---

<sup>12</sup>Guido una Toyota Cruiser di 20 anni (GV)



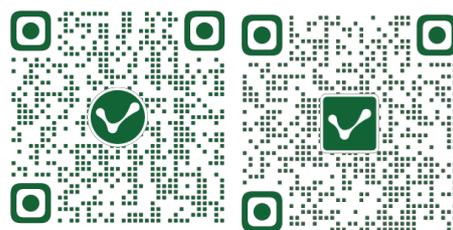
Fig. 18: Kit OPS pronto per l'uso, disponibile in commercio (VitaVetro Biotech Co., Ltd., Shenzhen, Cina).

**...ma come?**

Non vogliamo essere ridondanti. Sulla homepage del produttore ([www.vitavetro.com](http://www.vitavetro.com)) si può trovare il materiale didattico classico, la descrizione, il manuale e il video, tutto ciò che è necessario per la vitrificazione con l'OPS. Per istruzioni dettagliate potete anche leggere una cinquantina di pubblicazioni tra articoli di ricerca, review e capitoli di libri.

Inoltre, offriamo un nuovo percorso privilegiato. Immaginate un *timer intelligente* che vi dice *1. cosa fare*, *2. quando farlo*, *3. come farlo*, *4. perché farlo*. Con testi, disegni, immagini e video puntuali. E, mentre aspettate, tra una fase di lavoro e l'altra, vi fornisce dettagliate informazioni sul background scientifico e su altri aspetti rilevanti. L'unica cosa che dovete fare è sedervi al microscopio, avviare l'applicazione (Fig. 19) e lavorare secondo le istruzioni del *vostro coach virtuale*.

Ulteriori dettagli su OPSapp sono disponibili nel Capitolo 12.



Android

iOS

Fig. 19: I codici QR per OPSapp

Buona fortuna!

## 5. ... ADD-ON

*Più un vicolo cieco è lungo, più assomiglia a una strada*  
Mikhail Turovsky

Fin dall'inizio della pianificazione dei contenuti, la necessità di scrivere su questi argomenti ci ha preoccupato molto. In questo libro abbiamo espresso dubbi, preoccupazioni e critiche su molti temi. Eppure, abbiamo cercato di mantenere un sano equilibrio. Tuttavia, questo è il primo capitolo in cui non riusciamo a inserire una sola frase ottimistica. Questo pessimismo schiacciante potrebbe essere troppo per voi, quindi attraversiamolo rapidamente. Fortunatamente, negli ultimi anni sono state pubblicate numerose review con affermazioni che confermano perfettamente la nostra opinione; per chi fosse interessato ai dettagli, suggeriamo di cercare su PubMed "*IVF add-ons*". Per coloro che preferiscono una guida, l'elenco attuale al momento in cui scriviamo è dato da Datta et al., 2015; Harper et al., 2017; Kamath et al., 2019; Wilkinson et al., 2019; Macklon et al., 2019; van de Wiel et al., 2020; Lensen et al., 2020.

*Monitoraggio time-lapse* dello sviluppo embrionale. Il grande entusiasmo che ha accolto i design innovativi sviluppati su una vecchia idea si è trasformato, negli anni, sempre più in scetticismo. Curiosamente, uno degli autori di questo libro ha contribuito a lanciare entrambe le mode (GV, come coautore in Pribenszky et al., 2010, e Rienzi et al., 2015, rispettivamente). Esattamente come si poteva prevedere, durante il primo periodo, ogni singolo laboratorio che aveva acquistato una macchina time-lapse aveva riscontrato in uno dei molti parametri misurabili (dal momento della prima divisione all'inizio della blastulazione) un eccellente valore predittivo della competenza allo sviluppo in vivo. Tuttavia, contrariamente alle aspettative, il "parametro che determinava il destino" era diverso in ogni pubblicazione e in ogni laboratorio. Tanti sono stati i tentativi di risolvere tale confusione, o almeno di chiarire le ragioni dei risultati contrastanti. Sono stati chiamati in causa fattori quali le routine di laboratorio, i mezzi di coltura usati, l'atmosfera e così via, è stato migliorato il software, è stata coinvolta l'intelligenza artificiale, con un successo molto modesto. Alla fine, una recente review sistematica Cochrane (Armstrong et al., 2019) ha concluso che non ci sono prove che l'applicazione di sistemi time-lapse migliori i tassi di natalità. Va aggiunto che il time-lapse non è l'unico approccio che ha fallito: anche la classificazione morfologica convenzionale degli embrioni si è rivelata di valore limitato nel predire la competenza allo sviluppo.

L'opinione altamente parziale e soggettiva degli autori è la seguente: al momento, l'unico vantaggio comprovato dell'uso del time-lapse è che permette di decidere in terza giornata quando programmare il transfer, senza disturbare lo sviluppo. Per il resto, è un ottimo strumento di marketing e può fornire un ricordo speciale ai genitori fin dai primi momenti di vita del loro bambino. La maggior parte dei pazienti desidera usufruire della tecnologia time-lapse e addirittura sceglie le cliniche in base alla sua disponibilità. Vale la pena ricordare che, per un filmato, sarebbe più che sufficiente la versione più semplice fatta con il primo strumento time-lapse realizzato, il Primo Vision. Inoltre, a differenza delle versioni moderne altamente sofisticate, Primo Vision non aveva problemi legati all'evaporazione e funzionava perfettamente in un ambiente a umidità massima. Purtroppo, non viene più prodotto. L'Embryoscope, molto più costoso e dotato di tante funzioni superflue, è diventato il preferito dai produttori.

*Assisted hatching*. Un tempo, era l'approccio superstar, che includeva l'uso di diverse tecniche e richiedeva microscopi sofisticati, speciali integrazioni e grandi abilità manuali. Purtroppo, la gloria è svanita nell'ultimo decennio. Diverse review sistematiche non hanno riscontrato alcuna differenza nei tassi di nati vivi. Potrebbe ancora avere qualche limitato vantaggio nel caso di pazienti a scarsa prognosi, ma non è raccomandata come procedura di routine per tutti gli embrioni. Alcuni lavori hanno persino suggerito che l'assisted hatching può causare un aumento del numero di gravidanze gemellari monozigotiche.

*EmbryoGlue* (acido ialuronico). La scelta perfetta del nome ha garantito un successo immediato del mercato. Se l'attecchimento dell'embrione nella parete uterina è un momento critico dell'impianto - e lo è - allora una colla non può che essere utile. Forse una colla adeguata potrebbe davvero aiutare, ma non ci

sono ancora prove sufficienti che le formulazioni attuali migliorino il risultato complessivo. Inoltre, questo add-on può anche indurre gestazioni multiple.

*Test del DNA spermatico.* Sebbene una decina di anni fa sembrasse un approccio molto promettente, non vi sono prove che le indagini eseguite predicano gli outcome in modo affidabile.

*Attivazione degli ovociti con lo ionoforo del calcio.* L'efficacia e la sicurezza della procedura sono discutibili e non è raccomandata per la pratica clinica.

*Ulteriori selezioni degli spermatozoi (PICSI, IMSI).* Non ci sono prove che queste procedure siano efficaci e sicure. I parametri studiati potrebbero non essere del tutto pertinenti e alcune procedure di selezione potrebbero compromettere la qualità.

*PGS = PGT-A.* Ancora una volta, una situazione in cui la logica ("*trasferendo solo embrioni euploidi, i tassi di gravidanza e l'efficienza complessiva aumenteranno*") è smentita da alcuni fatti deludenti. Le ragioni includono l'imprecisione nella diagnosi, tra cui l'errata interpretazione del mosaicismo (Capalbo et al., 2021); perdite durante e dopo la procedura a causa di problemi tecnici; sistemi non ottimali in background (FIV, vitrificazione) che portano ad avere embrioni di qualità più scarsa e più vulnerabili. Di conseguenza, i risultati dei laboratori che utilizzano le tecniche in modo ottimale possono migliorare, mentre i risultati di altri gruppi con sistemi di base inadeguati diminuiranno ulteriormente dopo la PGT-A. In generale, la procedura potrebbe essere utilizzata per decidere in che ordine trasferire gli embrioni piuttosto che per scartare tutti gli embrioni apparentemente aneuploidi.

### ***Status praesens***<sup>13</sup>

Nonostante i risultati frustranti, gli add-on vengono offerti dal 30-66% delle cliniche di PMA negli Stati Uniti e meno del 10% di queste cliniche afferma che l'efficacia di una data procedura non è chiara. Al contrario, alcune di esse dichiarano con certezza che la PGT-A e/o il time-lapse migliorano i tassi di natalità (van de Wiel et al., 2020). Siamo pienamente d'accordo con l'affermazione di Jan Wilkinson et al. (2019): "*Non è affatto chiaro che la filosofia del "diritto di tentare", secondo la quale i trattamenti vengono venduti a persone vulnerabili su base speculativa, porta benefici oltre a chi li vende*".

Il "*primum nil nocere*" (per prima cosa, non nuocere) in senso lato vieta questo approccio, poiché si arreca danno a molti pazienti creando aspettative false e non supportate e dando un valore discutibile o nullo al loro denaro. Purtroppo, in molte parti del mondo, il "*caveat emptor*" (stia in guardia il compratore!) sta diventando una mentalità moralmente accettabile (Zemyarska, 2019).



---

<sup>13</sup> Termine medico ampiamente utilizzato nei secoli scorsi per descrivere lo stato attuale del paziente.

## 10. ESPLORAZIONE E INNOVAZIONE

*Dovrei rifiutare la mia cena perché non capisco bene il processo di digestione?*  
Oliver Heaviside

Se la ricerca è parte del vostro lavoro, appartenete a una fortunata minoranza di biologi della riproduzione. In ogni caso, questo capitolo può avere un valore pratico per tutti gli scienziati che lavorano con ovociti ed embrioni, anche se le circostanze sembrano ostacolare ogni processo creativo. Ciascun trattamento di FIV differisce dagli altri in termini di pazienti, trattamenti, morfologia dei gameti, procedure utilizzate in laboratorio, sviluppo degli embrioni, ecc. Parliamo anche dei nostri errori. La "*felix culpa*", un errore apparente con conseguenze positive inattese, è un fenomeno raro, anche se talvolta accade (vedi l'ultimo esempio con il vaccino COVID di Oxford<sup>14</sup>), quindi non bisogna arrendersi subito. Anche dai completi fallimenti si possono trarre conclusioni importanti. D'altra parte, i problemi pratici e gli incidenti possono stimolare la riflessione. Non pensate mai che "*se fosse così facile, gli altri l'avrebbero scoperto molto tempo prima*", perché è possibile che non l'abbiano fatto; un approccio simile al vostro potrebbe averli ostacolati.

### Tipi di ricerca e ricercatori

Solitamente si parla di scienza di base e applicata, vale a dire di ricerca accademica e innovazione che include lo sviluppo. Gli scopi dei due campi sono diversi, anche se sovrapponibili: rispettivamente, comprendere qualcosa o risolvere un problema pratico<sup>15</sup>.

Questi due tipi di ricerca richiedono due diverse tipologie di carattere. I ricercatori accademici sono persone sistematiche, pazienti, laboriose e scrupolose. Per loro la scienza è un'ameba enorme e in continua crescita che incorpora parti sempre più grandi del mondo sconosciuto. Lavorano molto bene in squadra e sono eccellenti insegnanti; rappresentano e reggono sulle loro spalle il peso e il prestigio della scienza. Sono la fanteria, gli addestratori, gli strateghi e i generali dell'esercito vittorioso.

Per l'innovazione è necessaria una mentalità diversa. Intuitivi, ossessivi, rampanti, "*No God, No Master*", con una volontà di ferro e un entusiasmo che rasenta il fanatismo (in un momento, e in profondo letargo in un altro). Persone indispensabili per un determinato compito, ma insopportabili per una collaborazione a lungo termine. Gli ussari, i temerari. Quelli che considerano la scienza come un tavolo da scacchi tridimensionale dove tutti possono muoversi in qualsiasi momento e in qualsiasi luogo. Hanno centinaia di idee folli, decine delle quali valide ma dimenticate e, in un caso fortunato, una sola realizzata che cambia le regole del gioco.

La scienza - così come l'esercito - ha bisogno di entrambe le tipologie. Nella Guerra dei Sette Anni, un manipolo di ussari ungheresi dell'imperatrice Maria Teresa conquistò Berlino molto prima delle forze prussiane, e rientrò con il tesoro. Nonostante questo, la guerra fu persa a causa dell'impotenza dell'esercito austriaco<sup>16</sup>.

Nell'embriologia di oggi abbiamo il problema opposto: abbiamo tanta fanteria, alcuni con ambizioni e talento, ma c'è un gran bisogno di spiriti liberi, sia in laboratorio che nell'anima. Non dobbiamo limitare il nostro bisogno di avventura esclusivamente ai videogiochi e confinare le nostre attività di laboratorio ai doveri quotidiani. Vi prego di capire: se noi embriologi restiamo passivi, nessuno potrà mai cambiare le tecnologie obsolete e migliorare i risultati. Non possiamo competere con le

---

<sup>14</sup> Con la dose prestabilita è stata ottenuta un'efficacia molto scarsa, pari al 62%. Tuttavia, quando per errore ai pazienti è stata somministrata una prima dose dimezzata, il risultato ha raggiunto il 90%.

<sup>15</sup> Dimentichiamo (per buone ragioni) l'obiettivo più comune, quello di scrivere una tesi o semplicemente una pubblicazione per il CV.

<sup>16</sup> La statua equestre del maresciallo conte András Hadik, capo dei gloriosi ussari, è una grande attrazione del Castello di Budapest, non solo perché onora un atto di eroismo unico, ma anche perché gli studenti nelle loro cerimonie accademiche annuali lucidano i testicoli dello stallone di bronzo.

multinazionali in termini di numeri e risorse, ma noi siamo in prima linea, possiamo vedere i problemi più chiaramente e abbiamo - si spera - la libertà di pensare e procedere.

## Risolvere un problema

Se queste argomentazioni non sono abbastanza convincenti, vediamo la questione da un altro punto di vista. Quando nella scienza si verifica un problema, l'approccio professionale è quello di chiedersi: *perché?* Perché è successo? Qual è stata la ragione, l'origine, quali fattori hanno contribuito, qual è il meccanismo esatto? Gli scienziati iniziano quindi a indagare su tutto ciò che può essere coinvolto, con tutti i mezzi e tutti i metodi disponibili, morfologia, istologia, chimica, immunologia, biologia molecolare, endocrinologia, time-lapse, analisi statistica, intelligenza artificiale, machine learning... e scrivono pubblicazioni, pubblicazioni e pubblicazioni - che ovviamente sono indispensabili. Tuttavia, nel frattempo sembrano dimenticare l'obiettivo originario.

E se invece all'inizio ci chiedessimo: *come?* Come possiamo risolvere il problema? Una volta trovata la soluzione, potremmo occuparci anche del problema stesso, se è ancora necessario.

Sembra un approccio poco professionale, ma nella storia della scienza ci sono esempi sorprendentemente frequenti riguardo all'applicazione di questa strategia. Basti pensare a Jenner, Fleming, Semmelweis. Si noti inoltre che non bisogna fare scoperte sconvolgenti per rendere immortale il proprio nome. Centinaia di premi Nobel sono stati dimenticati, mentre tutti quelli che hanno un minimo a che fare con le scienze naturali conoscono i nomi di Petri, Bunsen ed Erlenmeyer. Le loro scoperte scientifiche forse non sono state rivoluzionarie, ma le loro innovazioni sono sopravvissute per secoli.

## Il modello sperimentale

Passiamo alla fase successiva. Pensate che uno strumento progettato o una sostanza chimica da voi aggiunta possa migliorare una data procedura. Potreste aver bisogno di un modello sperimentale per testarlo.

Se l'obiettivo finale è l'applicazione sull'uomo, consigliamo vivamente di utilizzare embrioni o ovociti di animali per i vostri esperimenti. Il modello animale comunemente riconosciuto, il topo, presenta due svantaggi. I suoi ovociti ed embrioni sono più piccoli, richiedono strumenti diversi per la manipolazione e quantità diverse per la coltura. L'altro problema è ancor più di ostacolo: hanno anche caratteristiche biologiche diverse. In generale, gli ovociti e gli embrioni di topo sono più tolleranti negli esperimenti in vitro, meno sensibili agli sbalzi di temperatura e ad altre torture. Questa tolleranza può trarre in inganno gli embriologi e portare a definire parametri inappropriati per gli embrioni e gli ovociti umani<sup>17</sup>.

Invece, sia le dimensioni che le caratteristiche biologiche degli embrioni di bovino sono molto vicine a quelle degli esseri umani. L'aspetto più scuro, dovuto all'elevata quantità di gocce lipidiche citoplasmatiche, potrebbe spaventare a prima vista ma non rappresenta una differenza significativa nelle caratteristiche fondamentali. Utilizzando la tecnologia adeguata, l'esito della FIV e della coltura in vitro è simile a quello che si può ottenere sull'uomo. Per di più, anche la maturazione in vitro (a differenza dell'uomo) è molto efficace, e fornisce una fonte praticamente illimitata di ovociti a partire dalle ovaie provenienti dai macelli. I metodi utilizzati per la vitrificazione degli embrioni umani funzionano bene anche nei bovini, sebbene la vitrificazione degli ovociti sia comunque meno efficace.

L'altro potenziale candidato è il maiale. Potrebbe essere più impegnativo perché i suoi ovociti/embrioni sono più scuri e più leggeri; non precipitano sul fondo tanto facilmente. Entrambe queste caratteristiche sono il risultato della grande quantità citoplasmatica di lipidi, la cui funzione non è ben chiara. Gli embrioni

---

<sup>17</sup> Per non parlare poi delle questioni pratiche: i topi devono essere tenuti temporaneamente o permanentemente presso le vostre strutture, con conseguenti disagi e odori sgradevoli

umani e murini sopravvivono bene senza. Gli embrioni di maiale, se le scure goccioline lipidiche vengono rimosse (si può fare con relativa facilità, mediante centrifugazione ad alta velocità), sopravvivono e sviluppano bene; diventano persino più resistenti ai danni del congelamento. Ma gli embrioni "originali", "nativi" (anche se questa non è l'espressione più corretta) sono ottimi per testare sostanze chimiche, sistemi e interventi. La loro maggiore sensibilità può anzi essere considerata vantaggiosa: ciò che è tollerato dagli embrioni di maiale sarà, molto probabilmente, tollerato anche dalle loro controparti umane.

La maggior parte dei laboratori di FIV umana non può permettersi un reparto distinto con una facility, anche semplice ma completa, da utilizzare esclusivamente per la ricerca in embriologia animale. Tuttavia, potrebbe non essere impossibile stabilire una collaborazione reciprocamente vantaggiosa tra centri di PMA e le unità di riproduzione animale. Combinare gli elevati standard di un laboratorio di embriologia umana con la possibilità di disporre di centinaia di ovociti e migliaia di campioni di seme congelato, insieme alla grande libertà di sperimentazione in vitro, potrebbe risultare una situazione vincente sia per la ricerca vera e propria che, a lungo termine, per le risorse umane.

### **Il sistema di base**

Una condizione assolutamente indispensabile per qualsiasi studio di valore è un sistema di base altamente standardizzato e ottimizzato, un metodo che porti risultati quantitativamente e qualitativamente consistenti e comparabili con i migliori pubblicati in tutto il mondo. Il lavoro svolto con un sistema intrinsecamente inadeguato è inutile e le pubblicazioni basate su un tale sistema hanno un valore molto discutibile.

Quando si hanno problemi coi risultati, gli embriologi non devono tirare fuori la classica scusa. *Non bisogna dare la colpa agli ovociti!* È un trucco molto vecchio. Si può andare avanti qualche anno con questo continuo lamento e i risultati compromessi, ma alla fine a perdere saranno il vostro curriculum e il vostro futuro. Ci saranno fattori esterni ovunque e sempre: adattatevi, cambiateli, oppure trovate un nuovo posto con condizioni migliori.

Si deve aggiungere che i sistemi di alto livello devono essere considerati come un investimento per gli anni o persino decenni a venire. Se disponete di un singolo sistema top-level, ad esempio la coltura embrionale, qualsiasi fattore modifichiate o miglioriate avrà un grande valore e potrete pubblicare 1 o 2 buoni lavori all'anno. Se disponete anche di un altro sistema di alto livello, ad esempio la vitrificazione, si potranno realizzare 3-4 ottime pubblicazioni all'anno, senza grandi sforzi e attitudini creative. E se avete un terzo sistema di questo tipo, in uso in laboratorio oppure in collaborazione con una struttura esterna, ad esempio un centro di genomica di livello mondiale interessato agli aspetti embriologici, siete le persone più fortunate al mondo, e potrete pubblicare fino a 10 lavori all'anno, per 3-5 anni. Poi, arriverà il momento per un radicale rinnovamento o per un sostanziale cambio di strategia.

### **La selezione degli argomenti**

Il compito è ovviamente vostro; qui abbiamo raccolto solo alcuni spunti - tutto è soggettivo e facoltativo. Prendere o lasciare.

L'obiettivo deve essere ambizioso: bisogna ottenere miglioramenti evidenti, differenze che possano essere rilevate facilmente al microscopio o a prima vista nei report dei risultati, non solo grazie all'intelligenza artificiale, al machine learning e a sofisticati calcoli statistici. Si potrebbe dire: piccole differenze invisibili che alla fine si sommano in un considerevole effetto cumulativo. Questo può succedere, ma molto raramente. I lavori basati su effetti difficili da rilevare, anche se significativi, alla fine vengono citati al massimo una decina di volte per poi scomparire senza lasciare traccia e impatto.

Per farvi capire meglio, dovete *cercare di trovare l'anello debole della catena*<sup>18</sup> (Fig. 20), dove uno sforzo relativamente piccolo può portare a un notevole progresso. Sembra ovvio, ma può essere molto difficile da realizzare. Tuttavia, una volta trovato il punto giusto, siete già a metà strada verso la soluzione.



Fig. 20: L'anello debole della catena.

Non concentratevi sulle mode, a meno che non abbiate un'ottima ragione per farlo. Cercate di trovare aree nascoste o dimenticate in cui i vostri sforzi possano avere un impatto visibile. Se tuttavia volete o dovete comunque lavorare in un settore sovraffollato, utilizzate un approccio speciale che possa distinguere chiaramente il vostro lavoro da quello della folla.

Nei primi dieci anni di questo millennio, la ricerca sulle cellule staminali embrionali sembrava essere la grande promessa. Decine di migliaia di studiosi si sono precipitati nei laboratori e ai meeting con progetti grandiosi dai traguardi sorprendenti. Non per sminuire i risultati ottenuti ma, rispetto alle promesse, la montagna ha generato un topolino.

Nell'attuale decennio, tutti sono concentrati sulla selezione embrionale. Il valore intrinseco è enorme, soprattutto se lo rapportiamo ai progressi in questo campo. Abbiamo visto almeno una mezza dozzina di approcci e innumerevoli varianti, tutte capaci di fornire risultati eccellenti nelle mani dei loro ideatori; sono stati confermati da alcuni altri gruppi ma poi lentamente abbandonati, o applicati come add-on, come già detto in precedenza. Ora la nuova promessa sono l'intelligenza artificiale e il machine learning.

Con tutto il rispetto per i cyborg, il problema dovrebbe essere risolto dagli umani. Non è sufficiente selezionare gli embrioni migliori dalla coorte. Il compito principale è quello di creare una coorte migliore. Una vecchia legge dell'embriologia - oggi spesso dimenticata - dice che se si ha un sistema che produce il 50% di blastocisti e un altro il 30%, non significa che nel secondo sistema si avrà il 20% in meno di embrioni di buona qualità. Significa che non ne avrà nessuno.

A proposito, il momento più brillante della prima conferenza ESHRE online è stata la risposta informale di Amir Arav a una domanda: "Non dovremmo dare tecnologie sempre più intelligenti a persone sempre meno consapevoli". Senza offesa, amici miei.

---

<sup>18</sup> Termine utilizzato da V. I. Lenin per la Russia del 1917. In contrasto con il piano originale di K. Marx, Lenin propose di spezzare la catena imperialista nel suo anello più debole, cioè nella sua patria. L'uso di questa espressione non deve in alcun modo incoraggiare gli embriologi a fare una rivoluzione bolscevica nel loro laboratorio.

## Come procedere

*“Facile. Una volta individuato il quesito che volete studiare pianificate tutto nei minimi dettagli. Decidete i gruppi sperimentali, il numero di campioni per ciascun gruppo, il numero di ripetizioni, i checkpoint e l’outcome principale. Conquistatevi l’autorizzazione da parte dei vostri capi e delle autorità, preparate tutto e date inizio al vostro lavoro. Dopo 3-5 ripetizioni, mettete insieme i risultati, valutate la significatività statistica ed esponete i risultati ottenuti”.*

Sappiamo che vari tipi di studi possono richiedere approcci diversi e che ogni ricercatore ha il suo particolare percorso. Per esperienza, *lo schema sopra riportato è solo una vetrina per i risultati ottenuti.* Non ricordiamo un solo caso in cui questo schema sia stato applicato con successo.

La ricerca nel laboratorio di embriologia animale ha alcune caratteristiche uniche. I risultati sono osservabili in una settimana, il che rappresenta un fantastico vantaggio rispetto ad altri settori<sup>19</sup>. Comunque, anche se si tratta di animali, non vogliamo sprecare migliaia di embrioni per dimostrare che la nostra ipotesi o il nostro sistema sono totalmente errati.

Le idee, soprattutto quelle folli, devono essere testate senza troppa luce, preferibilmente da soli, a tarda sera nel laboratorio semibuio. Anche se avete cento campioni, sufficienti per quattro gruppi dignitosi, per il primo tentativo usate solo tre ovociti/embrioni. Poi scartateli subito dopo l’ovvio fallimento tecnico e ricominciate da capo. Dopo il quinto tentativo, è possibile che già abbiate una certa pratica del metodo; questo è il momento di iniziare a cercare il vero risultato, che sarà ancora pessimo. A questo punto, potete cambiare parametri, soluzioni, tutto. Se siete molto fortunati, dopo alcuni giorni (ognuno con 20-30 prove, quasi tutte un fallimento completo), inizierete a vedere una certa tendenza. E dopo una settimana, potreste avere alcuni campioni che vale la pena incubare per seguirne lo sviluppo. Anche se, nella maggior parte dei casi, occorre molta più pazienza<sup>20</sup>.

Non mentiamo nei nostri report. L’esperimento che pubblichiamo è stato eseguito esattamente secondo la descrizione e i requisiti. I calcoli statistici sono stati fatti, le conclusioni sono state tratte, tutto impeccabile, bello e autentico. Ma quando approcciamo l’ultimo esperimento, non è più entusiasmante; è piuttosto un noioso dovere. Sappiamo già cosa accadrà, a patto di non commettere un errore grossolano e stupido.

---

<sup>19</sup> Ad esempio, la cancerogenesi, dove un singolo esperimento può durare anni.

<sup>20</sup> La messa a punto di un metodo di vitrificazione più o meno efficace per gli ovociti bovini ha richiesto almeno 50.000 campioni e più di un anno di lavoro serale semiclandestino.

## 11. PUBBLICARE

*Molti medici preferirebbero avere un calcolo renale piuttosto che presentare un lavoro*  
Anonimo, JAMA, 174:292, 1960

A differenza di quanto accade nei thriller hollywoodiani, nella vita reale gli embriologi raramente sono ingaggiati da agenzie governative segrete o da potenze oscure. Al contrario, i risultati dei nostri esperimenti non sono riservati. Dopo averle protette legalmente - laddove necessario - condividere le nostre scoperte non è solo il nostro principale interesse, ma anche un nostro dovere morale e una nostra responsabilità lavorativa. I modi più riconosciuti per adempiere a questo compito sono gli articoli su riviste specializzate e presentazioni orali a conferenze nazionali o, meglio ancora, internazionali. I poster - se ancora esistono - hanno perso rilevanza nell'ultimo decennio, sia nella versione fisica che in quella digitale. L'unica cosa che conta è l'abstract, se viene pubblicato negli atti. Di recente, sono diventate popolari le risonanti conferenze stampa. Tuttavia, senza un solido background scientifico e un articolo impeccabile pubblicato nel giro di una settimana, questi spettacoli sono controproducenti, e minano il valore della ricerca e la reputazione del ricercatore.

La chiave del successo editoriale è

- trovare il messaggio giusto (il vostro prodotto sul mercato scientifico)
- assicurarsi che raggiunga la popolazione target (i clienti)
- ottenere l'effetto desiderato (molte acquirenti per il vostro prodotto).

Un'altra analogia, sempre dal mondo finanziario: una pubblicazione è come un'entrata in borsa. Esistono regole rigorose per sottoporre un prodotto a un pre-screening, per verificare se è vero, corretto e adeguato. In più, deve essere progettato e confezionato in modo opportuno. Infine, si deve dimostrare che è il proprio. I mercati azionari di rispetto hanno regole severe, ma probabilmente vale la pena investire tempo ed energie.

Torniamo ora alla scienza: pur soddisfacendo i requisiti, cercate di rimanere originali, innovativi e moderni.

### Stesura del manoscritto

"*Verba volant, scripta manent*"<sup>21</sup>. L'articolo sottoposto a *peer revision* è il modo più consolidato, autentico e rispettato di presentare un lavoro scientifico; è anche il modo migliore per valorizzare, valutare e distinguere i ricercatori e i loro risultati scientifici. Un risultato senza un documento è inesistente. Anche le date di presentazione-accettazione-rilascio sono importanti per determinarne la valenza.

Tuttavia, scrivere un manoscritto, inviarlo e gestire il processo di revisione non è il passatempo più diffuso tra gli scienziati. Ci sono sempre motivi per ritardare l'inizio, rimandare il proseguimento e interrompere il perfezionamento. A differenza del lavoro sperimentale, che è entusiasmante, più o meno contenuto, limitato e controllabile, la realizzazione del manoscritto è un'attività faticosa, meglio dire noiosa, l'ultima in fondo alla lista delle cose da fare, più spesso interrotta che portata a termine.

Anche noi ci confrontiamo con questi problemi, anche mentre scriviamo questo capitolo, proprio adesso. Quindi, vi suggeriamo una soluzione che ci è stata più o meno utile negli ultimi decenni. Se ora questo libro è finito, stampato e nelle vostre mani, è un forte argomento per seguire il nostro consiglio.

Secondo alcune antiche scritture, a Dio sono stati sufficienti sette giorni per creare l'universo; anche voi potreste non aver bisogno di più tempo per scrivere un articolo. In questo tempo, però, il manoscritto deve essere in cima alla lista delle vostre priorità, dimenticando le chat, le serie TV e i campionati sportivi.

---

<sup>21</sup> Le parole dette volano via, quelle scritte restano

Difficile ma possibile. Il trucco consiste nel frazionare il terribile compito in più parti più facilmente gestibili. Basta dedicare circa tre ore al giorno al lavoro più impegnativo e il resto della giornata alla riflessione.

Giorno 1. Due importanti decisioni da prendere oggi determineranno il destino del vostro manoscritto. La prima è il messaggio. Fate un'affermazione - possibilmente nuova, interessante, entusiasmante o (meglio ancora) provocatoria – che dovrete dimostrare. Se la vostra affermazione è solida, ne basta una per un buon articolo. Potreste volerne fare due, ma non di più. È meglio scrivere tre diversi articoli piuttosto che frammentare l'attenzione dei lettori. Gli scienziati, a differenza di un cuoco cinese, non possono gestire tre questioni contemporaneamente.

Ovviamente, il messaggio primario non ancora elaborato lo avete già in mente fin dall'inizio degli esperimenti; il compito di oggi è quello del tagliatore di diamanti per presentare solo l'essenza, il nucleo brillante del vostro ragionamento. Non dovrebbe richiedere più di una, al massimo due frasi.

L'altro compito è la scelta della rivista giusta. Sembra facile, e potete avere già alcune idee a riguardo, ma la decisione ultima richiede un'attenta riconsiderazione. Il numero di riviste di fama internazionale che si occupano di aspetti di laboratorio nella riproduzione assistita umana è piuttosto limitato, da 10 a 15, forse un po' di più se includiamo argomenti un po' al limite<sup>22</sup>.

Si devono considerare i seguenti punti:

- il settore specifico: criobiologia, tecnologie di laboratorio, ricerche combinate in vitro-in vivo, ecc.
- la lunghezza: lavoro di ricerca *full-length* o pubblicazione breve/tecnica (solo alcune riviste pubblicano questi formati);
- in una certa misura, l'ubicazione geografica: per esempio, le riviste ESHRE e ASRM preferiscono pubblicazioni provenienti dalle loro aree geografiche;
- requisiti e condizioni del formato: anche se sono stati pubblicati articoli che non seguivano perfettamente le linee guida, tenete conto che un manoscritto può essere rifiutato su due piedi per la più piccola incongruenza con i requisiti.
- le vostre preferenze soggettive, in base allo stile e al carattere di articoli simili pubblicati in una determinata rivista.

Infine, uno dei punti più critici è *il livello della rivista*, quantificato dall'*impact factor* (IF). Non svendete il vostro lavoro. Se il vostro manoscritto viene accettato immediatamente, probabilmente avete sottovalutato il suo valore. È meglio sottoporlo prima a una rivista due o tre categorie al di sopra del livello che avete stimato, piuttosto che una categoria al di sotto (cfr. Fig. 21). I rifiuti, anche ripetuti, servono a trovare la rivista con il più alto impact factor raggiungibile. Inoltre, nei report dei revisori ci sono sempre dei punti che vale la pena considerare.

---

<sup>22</sup> Se avete fatto una scoperta straordinaria potete puntare a riviste di altissimo livello come Nature, Science, JAMA, ma in questo caso non avrete bisogno dei nostri consigli, avrete molti "volontari" che si occuperanno della stesura del testo per esserne co-autori.

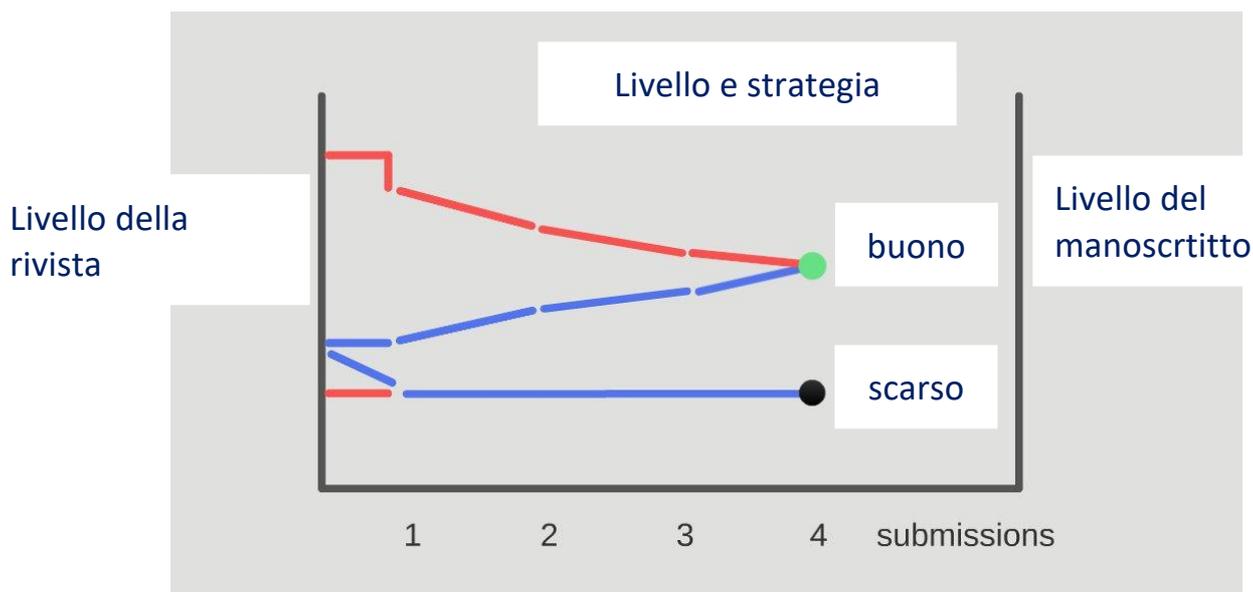


Fig. 21: Schema del processo di ricerca della rivista giusta per il proprio manoscritto. L'invio a una rivista di livello inferiore a quello del vostro manoscritto può comportare l'accettazione immediata e quindi un articolo con un basso impact factor. L'invio a una rivista di livello superiore potrebbe comportare un rifiuto immediato senza revisione; però, alla seconda sottomissione, potrebbe essere nuovamente rifiutato ma con una critica, magari devastante, da parte dei revisori. Tuttavia, utilizzando alcuni spunti della critica è possibile migliorare il manoscritto ed inviarlo ad una nuova rivista. Il valore del vostro lavoro potrebbe quindi ancora aumentare di gran lunga grazie ad ulteriori revisioni seguite da nuove sottomissioni e nuovi processi di revisione. Alla fine, il vostro manoscritto potrebbe venire pubblicato da una rivista con un buon impact factor. Comunque, le cose non sono così semplici e scorrevoli come appare dalla figura. Il processo è piuttosto traumatico e frustrante e sarà discusso più avanti in questo capitolo.

Alcune riviste, soprattutto quelle con il più alto *impact factor*, offrono verifiche preliminari all'invio (*pre-submission inquiries*). Questa generosa opportunità sembra preservare gli autori da inutili lavori di formattazione, ritardi e frustrazioni. In realtà il vero scopo è un altro: fare una potatura spietata, o anzi un taglio netto tra i potenziali autori, per riservare il complicato processo di revisione ai VIP e alle istituzioni più rispettate. Se non siete tra questi, le vostre possibilità di ricevere un invito sono minime; se siete VIP, non avrete certo bisogno di questo tipo di incentivo (e tu, caro collega VIP, molto probabilmente non leggerai mai queste righe): in sintesi, saltate questo passaggio, inviate il manoscritto così com'è e preservatevi la possibilità di una revisione approfondita, anche se dovesse concludersi con un rifiuto.

Giorno 2. Oggi comincia la vera scrittura. Iniziate leggendo attentamente le "Istruzioni per gli autori". Trovate un articolo nella rivista indicata che sia simile al vostro. Utilizzando sia le istruzioni che l'altro articolo come esempio, costruite il la pagina del titolo nella sua forma definitiva (!), includendo i caratteri richiesti, la spaziatura e seguendo tutte le regole di presentazione dei nomi, delle affiliazioni, dell'autore corrispondente. Se mancano alcuni dati (nome e cognome, indirizzo, affiliazione), segnate il posto e proseguite. Concludete in mezz'ora.

Ora avete per l'abstract, due ore e mezza, 150 minuti, quasi un minuto a parola<sup>23</sup>, dieci minuti per riga. Dovrebbe bastarvi! Procedete. Un abstract strutturato è come un questionario. Rispondete alle domande seguendo le istruzioni e l'altro articolo come esempio. Gli abstract tradizionali sono mini-articoli in un paragrafo: una breve introduzione e una domanda (2-3 frasi, 4-6 righe), poi un brevissimo riassunto dei

<sup>23</sup> Considerando un abstract di lunghezza media.

metodi, l'elenco dei risultati più importanti e una conclusione logica. Sulla base del vostro lavoro di ricerca e del messaggio impostato il giorno prima, la stesura di un abstract di una pagina non dovrebbe essere un problema.

Parliamo brevemente della *lista degli autori*. Dovreste invitare tutti gli autori che hanno contribuito al lavoro *in modo significativo*. Quest'ultimo concetto è importante. È consigliabile mantenere l'elenco breve. Al momento della scelta, e in qualsiasi altra situazione, siate tolleranti e diplomatici. Se c'è un conflitto tra i coautori, chiedete loro di discuterne. Cercate di rimanere neutrali. Se non trovano un accordo tra loro, o se venite coinvolti, rivolgetevi al vostro referente. Non fate da giuria nei conflitti: non è compito vostro. Allo stesso tempo potreste fornire al vostro referente un ruolo essenziale<sup>24</sup> e giustificare il suo coinvolgimento nell'elenco degli autori.

Le *keywords* servono per i motori di ricerca. Questi cercano anche nei titoli e non è detto che le cinque parole in più caratterizzino in modo autentico l'argomento del vostro manoscritto. Un sinonimo o una parola concettualmente simile (per esempio, "*cattle*", se nel titolo si parla di "*bovine*") può aiutare questi programmi informatici non troppo intelligenti a individuare il vostro lavoro.

Giorno 3. Ogni giorno, a partire da oggi, iniziate rileggendo attentamente ciò che avete fatto il giorno o i giorni precedenti e apportate le correzioni necessarie prima di procedere.

Avete un giorno intero per l'*Introduzione*. Non dite che non potete farlo! Tenete solo a mente quello che avete detto al vostro amico (sicuramente non al vostro coniuge) il giorno prima, quando vi ha stato chiesto di parlarne. Un bicchiere di vino - della stessa marca di quello che avete bevuto con il vostro amico - può rinfrescarvi la memoria e sciogliere i crampi alle mani. Siate rilassati, semplici e diretti.

Non occupatevi troppo delle referenze bibliografiche; inserite solo nomi o brevi note tra parentesi. Ricordate l'eterna regola delle abbreviazioni: scrivete il termine completo la prima volta e aggiungete l'abbreviazione tra parentesi. Dopodiché utilizzate solo la forma abbreviata.

Non dilungatevi troppo. Scrivete un paragrafo sul contesto generale, uno sul campo specifico includendo la questione che volete affrontare, e uno finale breve, di una o due frasi, sulla vostra domanda e sul vostro approccio. Contrariamente ad alcune nuove mode, suggeriamo di non parlare dei vostri risultati nell'introduzione; è come introdurre l'assassino nelle prime pagine di un thriller. Lasciate qualcosa anche per la Discussione.

Giorno 4. Oggi ci si dedica alla non tanto divertente stesura dei *Materiali e metodi*. A seconda del vostro lavoro, può trattarsi di un singolo metodo, di una sequenza lineare di metodi oppure di una ramificazione o di una rete di metodi. In ogni caso, la maggior parte dei passaggi è già stata pubblicata in precedenza da altri o da voi stessi: non dilungatevi; descriveteli brevemente con commenti come "... *as described earlier* (.....)", oppure "*Briefly, ...*", ecc. Al contrario, tutti i passaggi nuovi devono essere descritti in modo dettagliato. Lo scopo di questa parte è quello di permettere a chiunque di ripetere la tecnica seguendo la vostra descrizione<sup>25</sup>.

Ricordatevi che le aziende che forniscono prodotti chimici e strumenti devono essere indicate in dettaglio (numero di catalogo, nome della società, città, Paese) ma solo una volta. Per il prodotto successivo della stessa azienda, sono sufficienti il numero di catalogo e il nome dell'azienda. Riguardo le questioni relative ai pazienti, invitate un medico a descriverle; se non siete un medico, non dovrete essere responsabili di queste delicate tematiche, comprese le relative autorizzazioni e approvazioni.

---

<sup>24</sup>Forse l'unico.

<sup>25</sup> Non preoccupatevi. Anche se fate del vostro meglio, il 99% delle persone che cercano di ripetere il vostro lavoro, senza comunicare personalmente con voi, fallirà.

La *Statistica* è una parte indispensabile dei Materiali e metodi, con un breve paragrafo composto da due o tre frasi incomprensibili.

Giorno 5. Descrivere i *Risultati* richiede un lavoro mirato. Quanto più breve è questo capitolo, tanto meglio è. Di solito, in embriologia, è un brutto segno se si ha bisogno di un lungo paragrafo sui risultati per dimostrare il valore del proprio lavoro.

Quindi, nessuna scusa. Ricominciate a leggere tutto ciò che avete già scritto, reimmergetevi nell'atmosfera, seguite la scaletta delineata nei Metodi e iniziate a scrivere. I risultati sono nelle vostre mani. In questo capitolo descriveteli e basta: niente commenti, niente spiegazioni, niente interpretazioni. Ciò che serve è una descrizione il più possibile neutrale e oggettiva.

Utilizzate poche illustrazioni e brevi informazioni per ogni illustrazione. Tenete presente che solo circa la metà dei lettori controlla tabelle, grafici e diagrammi di flusso, e pochissimi di loro perderanno tempo/energia per comprendere dettagli complicati. Utilizzate le figure solo per i processi e i risultati più importanti e spiegate i dettagli nel testo. Al contrario, utilizzate le tabelle per fornire informazioni complete e nel testo fate riferimento solo a quelle più importanti. Comunque, in questa fase iniziale, sono sufficienti schizzi fatti a mano per le tabelle.

Questo capitolo è impegnativo non solo per voi, ma anche per i lettori. Usate frasi brevi e chiare. Cercate di rendere tutto il più semplice possibile. Una volta terminato, rileggete il capitolo più volte. La struttura dei paragrafi deve dare una chiara indicazione ai lettori sulla struttura degli esperimenti.

Il giorno 6 è per la *Discussione*. È il giorno in cui le vostre qualità di scienziati sono necessarie per inserire il vostro risultato nel quadro generale.

Si possono seguire diversi schemi; il nostro consiglio è solo uno dei tanti. Evitate di scrivere un'altra introduzione. Iniziate con una frase che descriva brevemente i vostri obiettivi iniziali quindi analizzate i risultati ottenuti passo dopo passo confrontandoli con quelli disponibili in letteratura. Cercate di descrivere come il vostro lavoro possa inserirsi in un contesto più ampio per ampliare le nostre conoscenze su una determinata questione. Potete confermare o confutare vecchie ipotesi e farne di nuove, ma siate prudenti e moderati nelle vostre affermazioni. Infine, scrivere un breve paragrafo di *Conclusioni* di 2-3 frasi.

Al solito, evitate di dilungarvi troppo. Cent'anni fa la lunghezza determinava quanto l'autore fosse remunerato pertanto gli scienziati scrivevano pubblicazioni di 40-60 pagine. Ora siete voi a dover pagare se volete pubblicare un testo troppo lungo<sup>26</sup>. Non includete ipotesi non supportate e, a meno che non sia assolutamente necessario, non fate riferimento a dati non pubblicati. Ancora più importante, non sopravvalutate i vostri risultati, siate modesti e obiettivi, lasciate l'entusiasmo ai lettori.

Giorno 7. Sebbene sia da tradizione il giorno di riposo (anche per gli Dei) è preferibile terminare il lavoro; rileggete il manoscritto, rivedete i capitoli (soprattutto la discussione), rendete le illustrazioni più formali, anche se non ancora definitive, e iniziate a inserire alcuni riferimenti bibliografici essenziali, secondo i requisiti della rivista. Assicuratevi che il manoscritto sia pronto per essere inviato ai coautori.

Mandatelo a tutti contemporaneamente e chiedete una scadenza a breve termine, ad esempio una settimana. Secondo noi, è molto meglio che rivolgersi a loro individualmente. In quest'ultimo caso, comincerebbero a correggersi a vicenda. Se invece avete tutti i commenti della prima versione, potete correggere voi il lavoro in un'unica fase, selezionando l'opzione migliore per ogni questione.

---

<sup>26</sup> Molte riviste offrono pubblicazioni open-access a pagamento e potrebbero diventare meno rigide nel processo di revisione

Durante la settimana in cui i coautori rivedono il manoscritto, si possono inserire tutti i riferimenti e le ultime versioni delle illustrazioni.

Quando tutto è pronto, si può inviare il manoscritto al coautore "principale" - non necessariamente l'ultimo - per un controllo finale. Dopodiché, non resta altro che sottometterlo, senza indugio.

### **Submission e revisione**

Questa potrebbe essere la parte più impegnativa dell'intero processo.

Innanzitutto, per rendere la nostra vita interessante e difficile, le Istruzioni per gli autori sono sempre più complicate. Per di più, i sistemi digitali per la sottomissione online - a malapena comprensibili - possono richiedere mezza giornata di ripetuti e frustranti tentativi per completare il processo<sup>27</sup>. Questi sistemi inseriscono barriere che non hanno nulla a che fare con il merito scientifico del lavoro; confinano la mente libera in una divisa scolastica "a taglia unica" e possono essere poco pratici e stupidi, una vera e propria non-intelligenza artificiale. Le statistiche sono feticizzate ma, per via del livello e qualità del materiale di partenza, i calcoli possono dimostrare praticamente tutto. In ultimo, i requisiti del formato dei riferimenti bibliografici sono la ciliegina sulla torta, ma cosa ci si può aspettare in un mondo in cui non sono bastati migliaia di anni per trovare un accordo sulle scale di misura per la distanza, il volume e la temperatura.

Dobbiamo poi parlare del processo di revisione stesso, che è molto lontano da quello che dovrebbe essere, cioè un controllo di qualità oggettivo. L'approccio e la struttura obsoleti non sono in grado di gestire adeguatamente il compito che è enormemente aumentato e i revisori non sono realmente motivati a fare del loro meglio.

Ci sono solo pochi veri esperti in un determinato campo; alcuni di loro non rispondono nemmeno all'invito a revisionare un manoscritto. Si noti che il lavoro del revisore non è premiato, non è apprezzato, non è retribuito e non è riconosciuto<sup>28</sup>. L'unico vantaggio di questo lavoro è quello di essere aggiornamenti tempestivamente sugli ultimi risultati, ma teoricamente questi dati non possono essere utilizzati o condivisi prima della loro pubblicazione<sup>29</sup>. Chi accetta la prima volta di fare una revisione, sarà presto sommerso di manoscritti e difficilmente riuscirà a fare una critica approfondita per ognuno. Scriverà brevi commenti sarcastici con conclusioni superficiali. Poi ci sono i Professori in pensione con molto tempo a disposizione e fama in discesa. Questi considerano l'invito come una rara occasione per mettere in mostra le loro abilità in declino e si ostinano su dettagli poco rilevanti e questioni linguistiche. Il terzo tipo di revisori è il vostro *competitor*: il suo unico scopo è quello di fermarvi ma potrebbe avere alcune argomentazioni valide che vale la pena prendere in considerazione.

Una revisione imparziale e corretta è rara come i denti di gallina - e potrebbe non essere presa sul serio dall'editore, il cui scopo principale è evitare scandali. Di solito hanno un'ampia disponibilità di manoscritti ben curati, formalmente perfetti, con un valore scientifico nullo e un impatto futuro ancora minore. Solo gli editori più coraggiosi e rispettabili, dotati di un'autorità unica, cercano le vere gemme e pubblicano articoli di vero valore, a volte anche contro il parere dei revisori. Citiamo due nomi tra i pochi che appartengono a questo rispettabile gruppo: Sir Robert Edwards e Sir Ian Wilmut.

La risposta può arrivare dopo giorni. In questo caso, è quasi sempre negativa: rifiutato. Queste lettere sono di solito brevi e non contengono informazioni preziose, se non la triste realtà. Non date troppo peso. E non

---

<sup>27</sup> Dobbiamo accettare che il mondo con i computer non è affatto migliore di quello che era senza computer. Non è nemmeno più veloce o più razionale. È solo diverso, offre molte opportunità di distrazione e ruba un tempo spropositatamente grande alla vita reale.

<sup>28</sup> L'elenco annuale provvisorio dei revisori nelle ultime pagine delle riviste è meglio di niente

<sup>29</sup> State pur certi: se il manoscritto contiene informazioni preziose, queste saranno utilizzate e condivise dal revisore, senza tanti scrupoli e immediatamente.

rimanete delusi. Fa parte della vita dello scienziato. Guardate il lato positivo, qualunque sia la decisione. Mentre leggete la lettera, iniziate a pensare al passo successivo (correzione, ripresentazione, altro invio). A questo punto agite da soli. Non condividete la notizia con nessuno. Preparate un piano per procedere. Siate il capo ORA! Trovate un'altra rivista, modificate il formato e inviatelo il prima possibile.

Se settimane dopo l'invio ricevete un rifiuto, in seguito ad un processo completo di revisione, probabilmente vale la pena prendere in considerazione i suggerimenti dei revisori, ma cercate di evitare di fare cambiamenti drastici. Fate le correzioni, eseguite la formattazione richiesta e inviate il lavoro a una nuova rivista entro una settimana o poco più.

(Secondo la nostra esperienza, almeno il 70% dei buoni manoscritti viene rifiutato almeno una volta. E il 90% dei manoscritti formalmente corretti viene infine pubblicato).

Una *Major revision* seguita da un nuovo processo di revisione comporta di solito molto lavoro, ma potreste avere il 70-80% di possibilità di pubblicare: sta a voi decidere se procedere. Molti lo fanno. In questo caso, cercate di reagire positivamente all'80% delle critiche e di modificare la parte del manoscritto che vi interessa (anche se non esattamente come suggerito). Quel 20% di critiche veramente inaccettabili richiede molta diplomazia e tolleranza. Cercate di evitare il confronto aperto, rimanete neutrali, non rispondete con degli sfoghi alle osservazioni arroganti. Gli editori apprezzeranno la vostra flessibilità e disponibilità al compromesso. Siate molto precisi nel segnare tutte le modifiche e nel rispondere a tutte le critiche singolarmente.

Aspettate un po' (da 3 a 4 settimane) per procedere con la *re-submission*; altrimenti potreste essere accusati di essere superficiali.

Una *minor revision* significa che potete nascondere una buona bottiglia di Champagne Brut<sup>30</sup> nel frigorifero del laboratorio, ma non apritela ancora. Il resto del processo non richiede istruzioni/suggerimenti. Procedete secondo il vostro istinto.

In conclusione, sappiamo che questi paragrafi non possono aiutare gran che a superare i problemi con la ricerca e le pubblicazioni. Tuttavia, la sensazione di non essere soli nelle proprie difficoltà può dare un po' di sollievo. Non c'è possibilità di cambiare le regole e le circostanze, ma ci sono modi per sopravvivere. Vi auguriamo tanta pazienza e perseveranza: ne avrete sicuramente bisogno.

## Presentazione

È davvero necessario parlare delle conferenze? Secondo l'opinione comune, sono solo pubblicazioni verbali<sup>31</sup>.

Questa modalità rende noiose le conferenze scientifiche, con le file semivuote ed un pubblico distratto. D'altra parte, questa situazione vi offre una grande opportunità di ottenere la dovuta attenzione sul vostro lavoro, una piacevole esperienza per i partecipanti e un improvviso riconoscimento per voi e i vostri risultati.

Questo sottocapitolo non è proprio parte essenziale di un libro che tratta di embriologia; quindi, se non siete particolarmente interessati o siete soddisfatti delle vostre prestazioni, saltatelo pure. Invece, per coloro che trovano il compito difficile o vogliono migliorare, le riflessioni che seguono possono essere di aiuto.

---

<sup>30</sup> Un Taittinger non vi deluderà mai (nessun interesse commerciale da dichiarare)

<sup>31</sup> Preferiamo non usare la parola alternativa per non provocare associazioni indecenti.

Innanzitutto, dobbiamo chiarire che un articolo e una presentazione sono molto diversi tra loro per vari aspetti, proprio come i romanzi e i drammi. Nella Tabella 1 riassumiamo i punti<sup>32</sup>.

	<b>Articolo (romanzo)</b>	<b>Presentazione (dramma)</b>
<b>Contatto</b>	Indiretto, impersonale	Diretto, personale
<b>Mezzo</b>	Scrittura	Multimediale (vista e suono sono fondamentali)
<b>Flusso di informazioni</b>	Unidirezionale	Bidirezionale (verbale + non verbale)
<b>Opinione</b>	Tipicamente imparziale	Parziale, persuasiva
<b>Atmosfera</b>	Neutra	Emozionale, un po' superficiale
<b>Cornice</b>	Definita	Flessibile
<b>Evento</b>	Irrilevante, N/A	Unico

Tabella 1: Differenze tra un articolo e una presentazione

Dobbiamo aggiungere che una conferenza scientifica è un *one-person show* in cui voi siete il drammaturgo, l'ideatore, il regista e l'unico attore. Il vostro unico appoggio è il programma che usate<sup>33</sup>.

Il lavoro inizia con la *costruzione* della presentazione. Definite un messaggio, quindi adattatelo alla situazione (presunta) e al pubblico previsto. Come sempre, suggeriamo alcune cose da fare e da non fare.

Fare

- sottocapitoli in base agli argomenti o ai messaggi,
- una struttura facile da seguire,
- *slides* facili da comprendere a prima vista,
- una presentazione chiara e logica.

E ricordate che il pubblico non può voltare pagina!

Non fare

- perdervi; assicuratevi che il pubblico sappia sempre dove siete (e dove è),
- entrare nei dettagli se non è assolutamente necessario,
- sottovalutare o sopravvalutare il pubblico,
- superare i tempi previsti (calcolate all'incirca una diapositiva al minuto),
- lamentarvi, scusarvi "per il compito difficile a causa del poco tempo a disposizione". Problema vostro. Risolvetelo.

Rendete ogni slide semplice: compatta e trasparente. Utilizzate un design simile per tutte le slide, compresa la disposizione, lo sfondo, i caratteri e le illustrazioni. Non usate caratteri piccoli; pensate alle persone sedute nelle ultime file. Evitate slide sovraccariche. Considerate Google: un fattore importante che ha contribuito al suo successo è stato il sistema estremamente semplice e lineare.

Allo stesso tempo però rendete interessanti le vostre slide. Dimenticate le presentazioni statiche e utilizzate le animazioni: siamo nel 21° secolo. Concentrate l'attenzione su frasi e argomenti che trattate realmente. Cercate di inserire qualcosa di emozionante e insolito, ma siate prudenti e modesti, mantenendo un sano equilibrio.

La preparazione – cosa molto importante anche se spesso trascurata - non si esaurisce con le diapositive. Anche i più esperti oratori si allenano ad ogni nuova presentazione. Come per gli attori, ci sono molti modi per impararla e provare; qui citiamo solo un possibile approccio.

<sup>32</sup> Parliamo di caratteristiche tipiche, ma ovviamente ci sono molte eccezioni.

<sup>33</sup> PPT non è affatto una scelta ovvia, alcune persone brillanti preferiscono PREZI

Finite di preparare le diapositive il giorno -8, cioè otto giorni prima dell'evento. Trovate una stanza vuota (a casa?) con il vostro computer e un timer e iniziate a parlare (a voce alta) ad un pubblico immaginario. I primi cinque minuti sono i più difficili. Ricominciate più volte per diventare fluenti - procedete lentamente con le altre diapositive. Cercate di trovare le espressioni migliori e memorizzatele. Evitate frasi lunghe, ma fate in modo che tutto sia chiaro e semplice. Se necessario, modificate le slide (di solito sono troppe!) per ottenere una presentazione fluida.

Fatelo ogni giorno, per almeno 1 ora. Il giorno -6, cercate di non fermarvi se fate un errore, correggetevi e proseguite fino alla fine. Dal giorno -4, cercate di parlare con "qualcuno" (una bambola, un'immagine), non con lo schermo. Non sedetevi, state in piedi. Gesticolate - senza esagerare - per sostenere le parole. Non esagerate con l'uso puntatore: lo dovrete sostituire con le animazioni. Usatelo brevemente e in modo mirato, se necessario: quel puntino rosso continuamente in movimento potrebbe rovinare l'intera performance.

Da questo momento in poi, aggiungete alcuni trucchi retorici. Il punto principale è: *non lasciate che si addormentino!* Tenete presente che il vostro scopo *non è trasmettere informazioni, ma convincere il pubblico*. Non considerate la vostra presentazione come un dovere, ma come un piacere, un grande momento, un'opportunità. Siate positivi, appassionati, entusiasti e (un po') unici. Rivolgetevi al pubblico con tutto il corpo. Motivateli. Provocateli. Fateli sorridere<sup>34</sup>.

E ricordate la cosa più importante: *non lasciate mai che il pubblico percepisca la vostra tensione*. Le persone non amano gli oratori agitati. Nel caso in cui si verifichino problemi tecnici (un video che non parte, ecc.), rilassatevi, siate freddi, aspettate. Non è colpa vostra. Seguite i suggerimenti del moderatore. (Stiamo già parlando del comportamento sul palco, ma questo è esattamente ciò a cui dovete prepararvi da soli nella vostra stanza).

Al giorno -2, potrebbe essere utile parlare a un piccolo pubblico, a dei colleghi, per esercitarvi dal vivo. Questo è particolarmente utile prima di un invito "unico nella vita" che potrebbe venirne seguito da molti altri, se avrete successo. Evitate di fare questa esercitazione davanti a un computer; organizzate tutto (proiettore, schermo, posti a sedere e monitor del relatore) come ad una vera conferenza. Ascoltate le domande, esercitatevi a rispondere, prendete sul serio tutti i suggerimenti.

Ora, *alla conferenza*. Tenete presente che non si tratta di un viaggio di piacere, soprattutto prima della vostra presentazione. Subito dopo esservi registrati, leggete tutte le informazioni sulla vostra sessione e tutti gli abstract che riguardano il vostro argomento. Se necessario, apportate le ultime modifiche alle slide o al vostro discorso.

Prima della sessione visitate la sala in cui si terrà la vostra conferenza. Controllate tutto, compresi computer, schermi, microfoni, puntatori. Assistete a una sessione simile, familiarizzate con il posto, le norme di abbigliamento, il comportamento, le domande e le risposte. Parlate con il personale informatico affinché il file della vostra presentazione sia trasferito in modo sicuro. Se avete dei dubbi, chiedete di poter verificare l'intera presentazione sui loro dispositivi.

Presentatevi in aula 15 minuti prima della sessione. Potreste essere richiesti per informazioni all'ultimo minuto o per risolvere qualche problema. Inoltre, è un atto di cortesia presentarsi al moderatore, e potrebbe avere anche un valore pratico.

Infine, *quando siete sul palco*, rilassatevi. Se avete fatto tutto come suggerito, sarà solo un grande momento. Sorridete e siate voi stessi.

---

<sup>34</sup> La prima risata fragorosa durante la vostra presentazione sarà un segno di successo, anche se è estremamente difficile da ottenere in certi Paesi.

*Dopo il vostro discorso*, ascoltate attentamente le domande e date risposte precise e brevi. Al massimo un minuto, circa cinque frasi. Evitate di fare un'altra lecture! Siate diplomatici ed educati, ma anche fermi, se necessario. Un consiglio molto importante: non iniziate mai la vostra risposta con lo stupido luogo comune "*Questa è una buona domanda...*". Non serve. Potrebbe essere addirittura offensivo (perché il vostro collega dovrebbe porvi una cattiva domanda?) e di solito implica che non conoscete la risposta.

Lasciate il palco nel modo più naturale e organizzato possibile, senza mostrarvi rilassati, stanchi, felici o delusi; potreste distruggere completamente l'immagine professionale che avete costruito con il vostro discorso. Infine, un ultimo avvertimento: non portatevi dietro il microfono o il puntatore.

*Dopo la sessione*, parlate cordialmente con chiunque si avvicini. Chiedete i loro contatti; una comunicazione continuativa nel tempo può portare a risultati sorprendenti. Allo stesso tempo, evitate di rispondere alle provocazioni. *Game over!*

## 12. CORREGGERE E PREVENIRE

*Nel mondo esistono circa quattro milioni di tipi diversi di animali e piante.  
Quattro milioni di soluzioni diverse ai problemi di sopravvivenza.  
David Attenboroug*

Abbiamo già suggerito l'approccio "per tentativi ed errori" per la risoluzione dei problemi. Ora, uno dei nostri più grandi insegnanti e idoli cita l'evoluzione come esempio da seguire. L'unico problema è che non abbiamo 3,5 miliardi di anni per risolvere i problemi nel nostro laboratorio. Tuttavia, abbiamo bisogno di pazienza, perseveranza e attenzione. Lavoriamo con un sistema biologico estremamente complicato e siamo responsabili della cosa più preziosa al mondo. Non possiamo permetterci, non possiamo rischiare un insuccesso.

Pazienza, perseveranza e attenzione: queste parole sono in netta contraddizione con la mentalità da ussaro elogiata nel Capitolo 10. Sì, siamo d'accordo. Ne siamo perfettamente consapevoli. Fa parte della vita scegliere l'atteggiamento più adatto ad una data situazione. Fortunatamente, oggi gli embriologi clinici non partono mai con zero background e zero indicazioni. Nella nostra routine, dobbiamo solitamente seguire una strada pavimentata. Tuttavia, le sfide più impegnative si presentano in due situazioni particolari: quando un vecchio metodo crolla e quando uno nuovo viene introdotto.

### **Il periodo difficile**

È un vero incubo per tutti gli embriologi. Una tecnica o una fase di lavoro consolidata crolla, i risultati scendono sotto i limiti accettabili e lì rimangono, nonostante gli sforzi. Questi periodi sono più comuni di quanto si pensi. Un sistema di controllo di qualità rigoroso e ben curato può evitare gran parte di queste situazioni, ma non escluderle del tutto.

Nella maggior parte dei laboratori, le linee guida per il controllo di qualità sono codificate in manuali operativi approvati dalle autorità. Anche i manuali di embriologia forniscono istruzioni e suggerimenti dettagliati. Vogliamo solo aggiungere che lo scopo principale di questi protocolli e doveri amministrativi è quello di aiutare a mantenere lo sviluppo embrionale efficace e senza problemi, non di eludere le responsabilità legali.

Quando avete la libertà di farlo, cercate di creare una situazione che aiuti intrinsecamente a evitare qualsiasi errore. Rendete tutto logico, semplice e facile; evitate inutili ornamenti. Mantenete in un ordine meticoloso il posto di lavoro (banchi, cassetti, scaffali, magazzini, ecc.), prestate estrema attenzione alla registrazione e alla corretta conservazione dei materiali e rispettate rigorosamente tutte le scadenze e i programmi di manutenzione. Inoltre, una vecchia regola che vale la pena prendere in considerazione: è meglio non lasciare il controllo di uno strumento allo strumento stesso e utilizzare dispositivi indipendenti ogni volta che è possibile. Allo stesso tempo però, non lasciate che le procedure di controllo ostacolino il normale flusso di lavoro e disturbino l'ambiente ottimale di ovociti ed embrioni.

Un modo eccellente, ma del tutto ignorato, per avere un controllo sicuro delle soluzioni è quello di acquistare un freezer di medie dimensioni da -80/-86°C. Secondo gli esperimenti condotti dalla nostra stimata collega Daniela Brandao in Danimarca e confermati più volte in vari laboratori di tutto il mondo, tutti i terreni di coltura pronti per la FIV, dal più semplice PBS al più complicato TCM-199 con albumina o siero, ormoni e altri additivi, possono essere conservati a queste temperature per un tempo indefinito. Tutto ciò che occorre fare è aliquotare e congelare piccole quantità di tutti i terreni collaudati e ben funzionanti e utilizzarli come controlli ogni volta che se ne ha bisogno. Il manoscritto che descriveva queste osservazioni è stato ripetutamente rifiutato dalle riviste più importanti, per cui non vi possiamo suggerire di usare i campioni congelati per il lavoro quotidiano, ma essi possono risultare di grande utilità per i controlli, per individuare ed eliminare qualsiasi problema causato da una spedizione o da una composizione di

qualità inferiore. Se il nuovo terreno di coltura produce uno sviluppo embrionale inferiore rispetto al controllo, il problema è legato al terreno di coltura.

Un modello animale accessibile, ben consolidato e affidabile - come discusso nel Capitolo 10 - può risultare di grande utilità. Tuttavia, problemi diversi richiedono l'uso di specie diverse. Per la coltura embrionale, il bovino è probabilmente il modello migliore. La maggior parte dei terreni di successo per uso umano si basa su analoghi bovini. Invece, il più noto modello murino può essere utilizzato per individuare errori drastici. Gli embrioni murini sono più tolleranti di quelli umani (e bovini). Ciò che è buono per l'uomo è solitamente buono per i topi, ma ciò che è buono per i topi non è necessariamente valido per l'uomo. Questa regola vale per la coltura embrionale; per la vitrificazione, la situazione è più complicata.

Un ultimo suggerimento pratico: attenzione ai *silent killer*. In base alla nostra esperienza, i due principali sospetti possono essere l'olio e il DMSO. Se notate misteriose forme anomale e degenerazione nelle vostre colture, cercate immediatamente di utilizzare un nuovo lotto di olio o di acquistarlo da un'altra azienda. Nei laboratori di embriologia clinica, molto probabilmente si lavora con soluzioni di vitrificazione pronte all'uso, dove il DMSO manterrà certamente la sua qualità entro la data di scadenza. Tuttavia, se dovete preparare i vostri terreni di coltura, utilizzate sempre confezioni di DMSO appena aperte per evitare la lenta degradazione e la formazione di formaldeide durante la ripetuta esposizione all'aria.

Nonostante la massima attenzione e cautela, i problemi possono insorgere. A un certo punto, il nostro sistema di produzione di embrioni bovini è collassato quando una piccola ventola all'interno del nostro "cavallo di battaglia", l'incubatore CO<sub>2</sub> Heraeus (utilizzato per la maturazione in vitro e per equilibrare i terreni), ha avuto un guasto al contatto. Abbiamo cambiato tutto, ma il motivo è stato individuato solo diverse settimane dopo, grazie ad un odore sospetto quando si apriva la porta dell'incubatore.

Registri accurati, sostanze chimiche di controllo, strumenti sottoposti a una corretta manutenzione potrebbero aiutare a ridurre il numero di guasti. Un approccio logico al *troubleshooting* può accelerare l'individuazione/eliminazione dei problemi. In ogni caso, quando in laboratorio si verificano periodi difficili evitate di prendere decisioni affrettate e a caso.

## **Il trasferimento di tecnologia**

L'acquisizione di tecniche messe a punto da altri può sembrare un compito più facile rispetto all'invenzione di tecniche nuove. Purtroppo, non è così. Al contrario, uno dei problemi più critici dell'attuale embriologia clinica è l'inefficienza nel trasferimento tecnologico che è causa di grandi differenze tra i vari laboratori e contribuisce in modo significativo a compromettere l'efficienza complessiva. Entrambe le parti - donatori e riceventi - sono responsabili. Tuttavia, il problema principale risiede nel processo stesso.

Prendiamo la vitrificazione, una procedura manuale apparentemente semplice e piuttosto rudimentale. Chiunque può impararla ed eseguirla in poche ore, al massimo un giorno. Perché allora vediamo decine di versioni che deviano dal metodo originale e compromettono seriamente il risultato? Perché sono necessari diversi mesi per raggiungere un livello accettabile e perché ci sono ancora notevoli differenze tra i laboratori anche dopo anni di applicazione continuativa?

In primo luogo, la vitrificazione non è così semplice come sembra. Ci sono molti piccoli problemi e trappole che richiedono attenzione, accorgimenti e molta pratica per essere superati, proprio come la guida di un'auto manuale.

In secondo luogo, non abbiamo scuole autorizzate ed esami ufficiali con requisiti severi. Non abbiamo una polizia che rilevi la guida impropria e punisca le azioni inadeguate con una multa, il ritiro della patente o addirittura il carcere. Beh, direte voi, guidare è pericoloso e le vite umane sono a rischio. E con la vitrificazione?

Non vogliamo inviare agenti di polizia armati nei laboratori di fecondazione assistita, ma nella nostra esperienza personale, la preparazione dei laboratori che ricevono la tecnologia non è adeguata. Ci sono serie questioni riguardo il corretto atteggiamento, in particolare la pazienza, la perseveranza e l'attenzione.

I donatori della procedura costituiscono un problema diverso: con la commercializzazione della FIV, l'apertura di chi dona sta diminuendo e aiutare potenziali concorrenti può andare contro gli interessi e le politiche della clinica. E anche dove non esistono restrizioni di questo tipo, i ritmi di lavoro e le infrastrutture limitate restringono le possibilità di insegnare ad altri.

Attualmente il trasferimento tecnologico è limitato a

- distributori, che (a parte rare eccezioni) hanno una formazione molto superficiale sui temi in questione e un tempo molto limitato per trattare con voi;
- esposizioni, dove tutti si concentrano su caffè, cibo e gadget;
- conferenze, il cui scopo è quello di creare interesse, non di insegnare;
- workshop, in genere brevi e sovraffollati e sono per lo più eventi sociali;
- manuali troppo brevi o troppo lunghi, che impediscono di concentrarsi sui dettagli importanti;
- video su Youtube, superficiali e sterili, senza possibilità di feedback.

Una visita di qualche settimana presso un laboratorio dove la tecnologia è gestita ai massimi livelli è un privilegio raro di pochi fortunati, per i motivi di cui sopra. Le visite di consulenti professionisti hanno più o meno successo, ma richiedono almeno una settimana presso una data unità e ripetute consultazioni online in seguito. La maggior parte delle cliniche non può permettersi questo tempo e queste spese. D'altra parte, il metodo più comune di trasferimento tecnologico, *l'insegnamento a catena* tra persone con una conoscenza moderata degli argomenti, ha un valore piuttosto limitato, poiché *la tecnica si corrode via via, ad ogni singolo passo*.

Semplificando la situazione: le aziende forniscono i terreni di coltura, le piastre, l'olio, le pipette, ecc. e l'embriologo ci fa quello che vuole. Forse è un'esagerazione, ma secondo la mia esperienza nei cinque continenti, la realtà non è molto diversa.

### **Un'opzione**

La maggior parte degli embriologi senior concorda sul fatto che i telefoni cellulari sono embriotossici, indipendentemente dal sistema operativo, dalla marca e dalla rete. In molte cliniche, il loro uso e addirittura la loro presenza in laboratorio sono vietati. Non potremmo essere più d'accordo. Tuttavia, suggeriamo un'eccezione.

I consulenti e gli esperti in uno specifico settore non possono visitare tutti i laboratori e rimanere lì per settimane ad insegnare ed istruire durante le prime prove di un nuovo metodo. Tuttavia, abbiamo trovato una scorciatoia senza spese e senza la (potenzialmente fastidiosa) presenza personale.

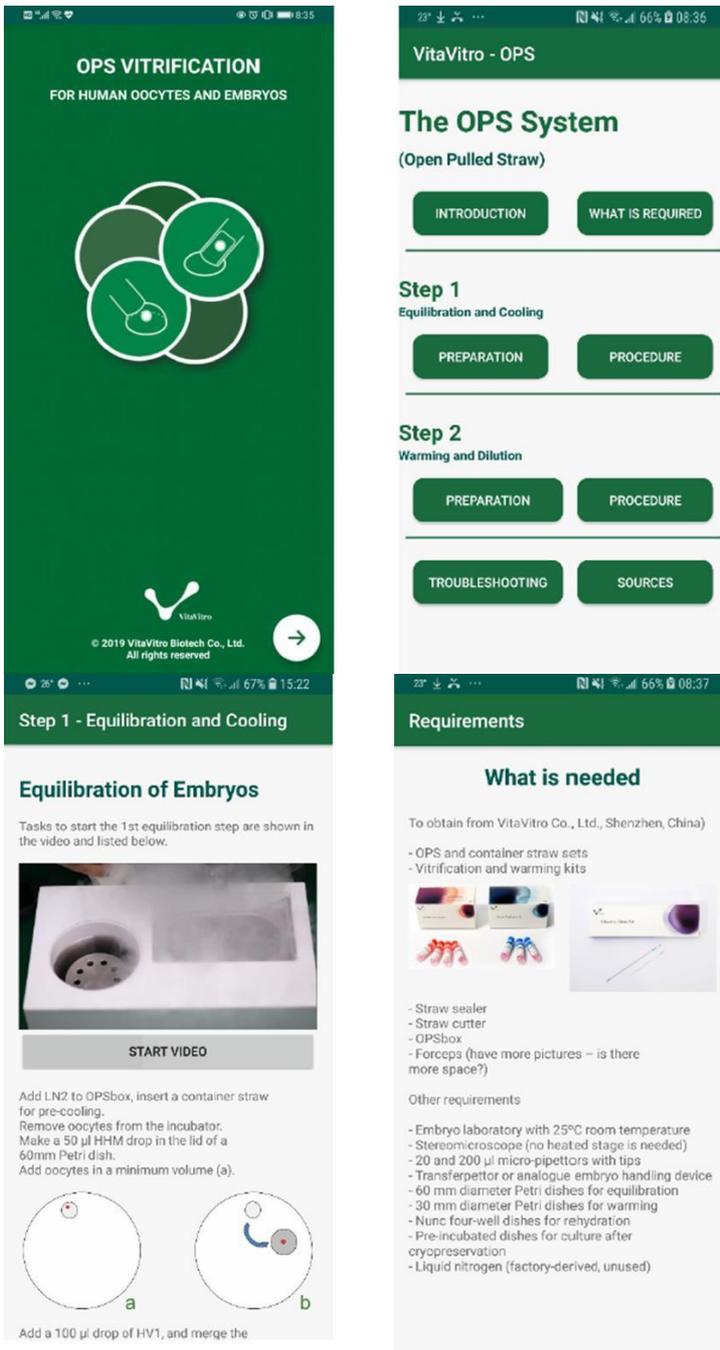
Come descritto nel Capitolo 8, abbiamo creato un'applicazione abbinata a un timer che ci guida in tutti i passaggi necessari per eseguire una vitrificazione con OPS, secondo un programma temporale predisposto dal timer stesso (Fig. 22). L'app fornisce ampie informazioni utilizzando testi, disegni, immagini e video in tempo reale. Durante i momenti di attesa tra le varie fasi di equilibratura e warming vengono fornite spiegazioni puntuali sul background scientifico della procedura.

Quindi, l'unica cosa che dovete fare è sedervi al microscopio e lavorare secondo le istruzioni del vostro coach, cioè dell'app, che non è un manuale, non è un video, non è una guida, ma è un vero e proprio assistente, che fornisce

- *istruzioni step-by-step* e durante l'intero processo di vitrificazione-warming;
- *informazioni interattive e personalizzate* con possibilità di scegliere il percorso più adatto;

- ampia possibilità di ottenere *vaste conoscenze sull'argomento*, opinioni e suggerimenti;
- *contatto diretto con l'ideatore e produttore*.

Non vogliamo dire che questa app sia la soluzione, ma speriamo che sia un passo avanti. Aspettiamo le vostre opinioni e i vostri suggerimenti; insieme, potremo trovare approcci sempre più validi e ottimizzare i sistemi per il trasferimento tecnologico e il miglioramento del lavoro di laboratorio.



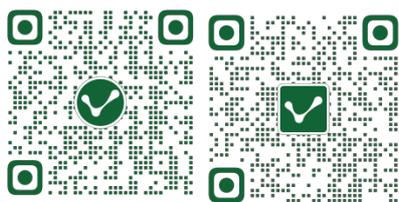


Fig. 22: Immagini dell'OPSapp, con i codici QR per Android e iOS, rispettivamente (di nuovo...)

### 13. LA NOSTRA MISSIONE

*Alta tecnologia? Scordatelo. La FIV è una tecnologia bassa*  
Rodney Wade

#### Così si pensa che sia?

Nel 2018 abbiamo festeggiato il 40° compleanno di Louise Brown e quello della nostra scienza, la riproduzione umana assistita. Come accennato poco fa, in questa occasione sono state pubblicate pagine speciali su importanti riviste. Fertility and Sterility ha invitato 66 scienziati di rilievo, pionieri di determinati campi, che hanno fatto una panoramica della loro specifica area di studio, usando spesso frasi come "il progresso più importante", "migliorato drasticamente", "lo sviluppo più completo", "tremendamente", "sostanzialmente", ecc. in 140 pagine (Niederberger et al., 2018). Quasi tutti gli articoli erano ottimistici e soddisfatti dei risultati ottenuti in passato, delineando prospettive brillanti per il futuro.

Questa immagine è ben diffusa anche tra il pubblico. L'embriologia è comunemente considerata dai non addetti ai lavori come una scienza all'avanguardia, con strumenti altamente sofisticati, metodi perfettamente standardizzati e professionisti di alto livello con grandi capacità innovative. I risultati vengono descritti come sorprendenti e l'intera disciplina viene classificata come pari, o addirittura superiore, all'informatica, alla ricerca spaziale o alla fisica teorica. Se il mondo esterno dovesse dare un'opinione, ci rimprovererebbe un progresso troppo rapido, obiettivi troppo ambiziosi e risultati audaci. Lo scarso progresso, la poca creatività, i metodi obsoleti e gli approcci arcaici non vengono mai presi in considerazione, e nessuno parla dello scarso impatto della nostra scienza sui problemi che avrebbe potuto risolvere.

Non abbiamo alcuna intenzione di mettere in dubbio le affermazioni dell'importante rivista americana. Ci è sfuggito solo un riferimento tra i 643 citati, quello di Gleicher, pubblicato sulla stessa rivista l'anno precedente. Le sue affermazioni sono state ulteriormente spiegate due anni dopo in un articolo open-access (Gleicher et al., 2019) che include una figura che mostra i tassi di natalità annuali negli Stati Uniti a seguito di cicli di FIV autologa dal 1995 al 2016. Una crescita sorprendente nei primi anni, seguita da una fase di plateau e poi da un forte calo dopo il 2013.

Un altro problema, questa volta dall'Inghilterra. Nel gennaio 2020, il noto quotidiano Daily Mail ha pubblicato i tassi di successo peggiori e migliori delle singole cliniche di fecondazione assistita in Inghilterra. La differenza nei tassi di nati vivi/ciclo iniziati era di 3,6 volte (12 contro 43%). Le due cliniche si trovano a soli 50 minuti di auto l'una dall'altra. Secondo le statistiche della Human Fertilisation and Embryology Authority, nessuno di questi risultati era sorprendentemente diverso dagli altri e i risultati delle restanti 77 cliniche erano equamente distribuiti in una scala di valutazione.

Questi esempi possono far sorgere qualche dubbio sul fatto che siamo davvero "supremi", o che siamo almeno il meglio possibile.

Ovviamente, la PMA non sarà mai in grado di risolvere tutte le situazioni correlate all'infertilità, e ci sono seri fattori esterni che ostacolano l'applicazione di queste sofisticate tecnologie a tutti coloro che ne hanno bisogno (Ombelet, 2014; Parikh, 2013). L'aumento annuale delle nascite da fecondazione assistita sta rallentando; in alcuni Paesi sviluppati (!) i numeri sono stazionari. Siete consapevoli del fatto che, con le risorse e l'efficienza attuali, possiamo aiutare solo 1 coppia infertile su 20? E anche con un aumento del 10% all'anno (che è molto al di sopra della realtà attuale) potrebbero volerci 20 anni per riuscire ad aiutare solo il 30% di coloro che ne hanno bisogno?

La risposta sincera alla domanda iniziale è che, nonostante i risultati impressionanti, la PMA non è riuscita a compiere la sua missione e, con la tendenza attuale, la situazione non cambierà radicalmente in un futuro prossimo, nemmeno per la prossima generazione.

## Embriologia di laboratorio

Non possiamo ignorare la nostra responsabilità verso questi problemi.

L'ottimista si aspetta che il futuro porti notevoli miglioramenti, nuove e brillanti idee ed entusiasmanti tecnologie che aumentano l'efficienza del laboratorio e garantiscono un futuro roseo alla PMA. Tuttavia, questa aspettativa non è ben fondata: l'epoca delle innovazioni rivoluzionarie nell'embriologia dei mammiferi si è conclusa all'inizio degli anni Novanta. Negli ultimi vent'anni siamo riusciti a sfruttare le risorse del passato perfezionando le procedure, regolando i parametri e affinando gli strumenti, ma senza introdurre approcci innovativi. FIVET, SUZI, ICSI, biopsia degli embrioni, assisted hatching, vitrificazione e persino il time-lapse erano già disponibili.

Un laboratorio di genetica molecolare di livello mondiale alla fine degli anni Ottanta consisteva in poche centrifughe, bagni d'acqua, camere per l'elettroforesi su gel orizzontali e verticali, una macchina per la PCR e transilluminatori UV. Addirittura, i Southern blot venivano eseguiti con tovaglioli di carta presi nelle toilette. Immaginate un ricercatore di questo laboratorio che, dopo 25 anni di coma, torna in una moderna struttura di genomica e si aggira disorientato tra macchine completamente automatizzate, chiuse ermeticamente e con gli schermi dei computer che lampeggiano misteriosamente.

E ora, immaginate la stessa situazione con un embriologo. Cosa troverebbe? Incubatori, cappe a flusso laminare, stereomicroscopi e micromanipolatori. Quasi esattamente come 25 anni prima, con l'aggiunta di piccole comodità come le micro-pipette e i terreni di coltura pronti all'uso (anche se con composizione sconosciuta o solo parzialmente nota) e inconvenienti come il divieto all'uso delle pipette a bocca. Così, in cinque minuti, lo scienziato viaggiatore del tempo potrebbe sedersi al suo posto di lavoro e riprendere la sua attività, proprio come faceva 25 anni prima. Il tempo si è fermato, non solo nei contenitori di azoto liquido ma anche nell'intero laboratorio.

### Perché?

Come già accennato, gli attuali contesti legali, i regolamenti, le linee guida e i manuali di laboratorio non consentono una libertà di ricerca pari a quella esistente 40 o 30 anni fa. La sperimentazione con gli animali e soprattutto con gli embrioni umani è oggi fortemente limitata. Anche gli approcci consolidati mantengono a lungo l'etichetta di "sperimentale" e in molti Paesi è richiesto un permesso speciale per l'applicazione clinica. Per perdere l'etichetta di "sperimentale", queste procedure devono dimostrare i loro benefici e la loro innocuità sia a breve che a lungo termine, preferibilmente attraverso studi prospettici randomizzati multicentrici su larga scala e successivi studi di follow-up (Harper et al., 2012, Brison et al., 2013, Legro e Wu, 2014, Provoost et al., 2014).

La verità è che è molto difficile soddisfare queste condizioni. Le procedure più recenti che sono state accettate su larga scala nei laboratori di PMA non hanno superato, ma sono riuscite a evitare, queste restrizioni. La PGD e la PGS (PGT-A) hanno ottenuto un notevole successo soprattutto grazie al rapido sviluppo dei metodi diagnostici, non della parte embriologica. Il time-lapse è stato rapidamente accettato in tutto il mondo perché il "fotografare nell'incubatore" non richiedeva permessi speciali quando è stato fatto la prima volta. Il cambiamento più eclatante dell'ultimo decennio, l'applicazione su larga scala della vitrificazione, si è verificato come uno spartiacque a partire da alcune cliniche con particolare coraggio e/o in una situazione particolare. In seguito, il nuovo metodo si è diffuso per anni silenziosamente in molti Paesi e solo di recente è stato riconosciuto come procedura standard in alcuni di essi, mentre metà del mondo già lo utilizzava nella pratica quotidiana.

Per la ricerca clinica, la rigidità a privilegiare studi multicentrici prospettici e randomizzati è controproducente, il loro costo è proibitivo e le risorse disponibili sono ingiustamente selettive. L'assenza di ricerca in embriologia umana presso le istituzioni accademiche, la mancanza di sostegno governativo per le unità indipendenti e la mancanza di supporto da parte dell'industria lasciano la ricerca e lo sviluppo al

carico delle cliniche di fecondazione assistita. Purtroppo, le loro tipiche dimensioni e il background finanziario non consentono loro di assolvere questo ruolo. Molte pubblicazioni riflettono l'approccio del tipo "*di recente abbiamo ottenuto risultati interessanti, vediamo se possiamo pubblicarli*"; altre affrontano un problema potenzialmente interessante ma il disegno sperimentale è carente, o il sistema di base è inadeguato, e l'entità del miglioramento dichiarato è difficile da valutare. La mancanza di studi validi è penosamente visibile nella descrizione dei Metodi in una tipica review sistematica che tratta questioni comuni e molto semplici, come la vitrificazione rispetto al congelamento lento, la bassa concentrazione di ossigeno rispetto a quella normale, ecc. Una ricerca automatica degli studi produce migliaia di pubblicazioni, la successiva selezione manuale riduce il risultato ad alcune decine di pubblicazioni rilevanti, di cui solo una minima parte soddisfa (più o meno) i rigidi criteri di selezione richiesti per rispondere correttamente alla domanda posta (Cohen e Alikani, 2013, Evers, 2013, Simón e Bellver, 2014). Alla fine, la maggior parte delle review sistematiche non raggiunge le conclusioni attese, risolvendo che "sono necessari ulteriori studi", anche se tali studi, adeguatamente sviluppati, probabilmente non saranno mai portati a termine e la nostra scienza continuerà a procedere su strade dissestate.

### **La nostra situazione**

Abbiamo accennato in precedenza a questioni esterne (strutturali, finanziarie, legislative). Abbiamo anche parlato dei tipi di approccio preferiti dagli embriologi. Torniamo ora su quest'ultimo argomento, da un punto di vista diverso, utilizzando un tono più provocatorio e di parte, che comunque non è molto lontano dalla realtà.

Si potrebbe pensare che il prestigio e il richiamo dell'attenzione pubblica possano creare un ambiente favorevole alla ricerca in embriologia. Purtroppo, è vero il contrario. La notorietà è controversa e può portare a una selezione negativa. I ricercatori competenti ma più riservati si spaventano di fronte all'inevitabile attenzione che il loro lavoro genera, e quelli che amano la visibilità prediligono settori meno problematici.

Dall'altro lato, il lavoro in un laboratorio di embrioni richiede un programma rigoroso e impegnativo, un alto livello di precisione, abilità manuale e, soprattutto, dedizione. Sebbene queste condizioni siano considerate dai non addetti ai lavori come scontate per tutte le attività di laboratorio, molti candidati ne sono scoraggiati e scelgono una materia più facile e confortevole.

Oggi, un tipico laboratorio umano di FIV non è in grado di ospitare scienziati creativi. Al contrario, il periodo di formazione mira a spegnere tutti i tentativi di pensare in modo originale e di cercare soluzioni alternative. Il principio "prima impara cosa sta succedendo, poi potrai migliorarlo" sembra ragionevole, ma la seconda metà della frase viene poi dimenticata. La grande macchina regolata da esigenze finanziarie e legali schiaccia gli individui e crea dipendenti obbedienti. La situazione soddisfa gli interessi del presente, ma chiude la strada verso il futuro.

Ovviamente ci sono delle eccezioni. Si possono trovare occasionalmente direttori di larghe vedute e membri del personale validi che possono rischiare un futuro sicuro per un'idea brillante, ma il loro numero è tristemente esiguo. Alcune grandi cliniche hanno creato e mantenuto un gruppo di ricerca più o meno indipendente, anche se il loro impatto sul progresso dell'embriologia umana è stato finora modesto.

### **Le nostre responsabilità**

Oltre a enumerare i vari fattori oggettivi, dobbiamo anche menzionare la nostra responsabilità nel riconoscere ed accettare questa situazione contraddittoria. Come detto, sebbene in molte unità di PMA gli embriologi vengano chiamati eufemisticamente scienziati, il loro ruolo effettivo è più vicino a quello di tecnici. Ancora più frustrante è il fatto che sembriamo accettarlo. Ciò che prima era considerato restrittivo oggi viene sopportato o addirittura ritenuto normale, forse perché ci sono poche altre opzioni disponibili. Limitare il pensiero creativo ha gravi conseguenze sull'innovazione e ostacola anche il lavoro di routine.

Continuano ad essere acquistati e utilizzati strumenti con evidenti difetti di progettazione e terreni con componenti sconosciute. Di conseguenza, è limitata la possibilità di risolvere i problemi e c'è una tendenza crescente a rivolgersi a un aiuto esterno (di valore discutibile) anche in situazioni in cui un po' di riflessione pratica o una ricerca nella letteratura scientifica disponibile fornirebbero una risposta ovvia.

## La soluzione

In primo luogo, dobbiamo riconoscere che negli ultimi decenni i miglioramenti in termini di efficienza sono stati considerevoli. La mancanza di innovazioni radicali può essere interpretata come una normale e naturale conseguenza di cicliche rivoluzioni ed evoluzioni. Si può fare l'esempio delle automobili che sono state praticamente le stesse negli ultimi 80 anni: quattro ruote, volante, freno, frizione, candele, ecc. Poi è avvenuto un improvviso cambiamento radicale, la comparsa delle auto elettriche a guida autonoma.

La messa a punto e l'ottimizzazione possono ancora avere un certo potenziale in discipline correlate, tra cui la biologia molecolare e la genomica, e possono aiutarci ad aumentare ulteriormente i nostri risultati. Tuttavia, non possiamo limitarci a sperare nell'aiuto esterno. Dobbiamo apportare cambiamenti fondamentali anche nel nostro lavoro di laboratorio. Dobbiamo cambiare il nostro modo di pensare al futuro.

Invece di analizzare scrupolosamente ogni settimana le differenze individuali tra gli embriologi sui risultati della ICSI, dobbiamo realizzare macchine ICSI completamente automatizzate con programmi regolabili e parametri precisi, le cui prestazioni non sono influenzate dalla manualità e dallo stato emotivo dell'operatore. È un compito tecnologico estremamente impegnativo? Forse. Sarebbe costoso? Forse. Tuttavia, solo vent'anni fa, per decodificare il genoma umano sono state spese tonnellate di puntali di plastica e 3 miliardi di dollari. Con lo sviluppo di nuove generazioni di macchine ogni anno, il sequenziamento è ora completamente automatizzato e i costi sono stati ridotti di 3.000.000 di volte, fino a 1.000 dollari nel 2014. Un'ulteriore riduzione sotto i 200 dollari è avvenuta nel 2019. <https://www.wired.com/story/whole-genome-sequencing-cost-200-dollars/>. Molto presto, la vecchia previsione del BGI di Shenzhen, in Cina, diventerà realtà: il sequenziamento dell'intero genoma sarà più economico del costo di spedizione del campione.

Vale la pena investire? Abbiamo ottenuto una riduzione dei costi, almeno di quelli di laboratorio, di un ciclo medio di PMA dal 2001, aumentando radicalmente la precisione e l'efficienza complessiva?

Il problema principale del nostro approccio è che non possiamo sottrarci alla trappola delle pipette, delle piastre Petri, delle cappe a flusso d'aria, degli stereomicroscopi, dei micromanipolatori e degli incubatori a gas. In realtà, la PMA di prossima generazione potrebbe essere eseguita in macchine compatte delle dimensioni di un computer portatile, reti di micro-canali monouso controllate da telecamere e sensori multipli, e il ruolo degli embriologi potrebbe essere semplicemente quello di azionare l'input (liquido follicolare aspirato, sperma eiaculato), approvare o correggere le decisioni automatizzate in diversi punti di controllo e di trasportare gli embrioni in sala operatoria. Proprio come avviene nell'aviazione, nella produzione di automobili, nella genomica e - esempio molto vicino - nelle macchine per i test di laboratorio. Ci si può preoccupare del mercato ristretto, dei costi elevati e delle difficoltà tecniche. Tuttavia, 3.000 cliniche in tutto il mondo, che aumentano di anno in anno, possono fornire le risorse necessarie, considerando la necessità di più macchine nella maggior parte di esse.

La rapida diffusione delle macchine time-lapse ha dimostrato la capacità di acquisto delle cliniche. La microfluidica (se i micro-canali sono la soluzione) è ovviamente più impegnativa e complicata, ma l'incapacità di ottenere rapidi progressi negli ultimi 15 anni è deludente. Problemi come "non riusciamo a eliminare le bolle", ecc. ostacolano le applicazioni e bloccano progetti promettenti, mentre il sistema si è dimostrato adatto a (quasi) tutto ciò che serve per la PMA e persino per il trasferimento nucleare di cellule somatiche (Vajta et al., 2005, Krisher e Wheeler, 2010, Smith e Takayama, 2017, Ma et al., 2011, Matsuura et al., 2013).

Abbiamo solo bisogno di qualcuno - o meglio, di un'équipe – capace, di una cospicua somma di denaro e di un'industria determinata a mettere insieme i pezzi in modo corretto. Forse abbiamo bisogno di qualcosa di più: diversi gruppi che competono e un grande sostegno scientifico, tecnico ed emotivo da parte della comunità degli embriologi.

Un'altra questione è quella di permettere alle macchine di determinare il destino di potenziali esseri umani. Questa preoccupazione può sembrare giustificata, ma lasciamo che i dispositivi gestiscano treni della metropolitana, aerei, interventi diagnostici e terapeutici e, molto presto, metteremo le nostre vite nelle loro mani ogni volta che saliremo in auto. Siamo sicuri che le nostre mani tremanti e la nostra attenzione saranno sempre in grado di gestire gli embrioni meglio di sofisticati robot progettati per questo specifico scopo?

Certo, il controllo sarà sempre necessario. Questa è anche la risposta alla preoccupazione seguente: il futuro ruolo degli embriologi. Anche questo aspetto dovrebbe evolversi. Si aprirà un altro livello di opportunità e responsabilità professionale, molto simile a quello dei piloti che controllano l'atterraggio automatico di un Dreamliner.

Più contribuiamo allo sviluppo, più il risultato potrebbe affascinarci.

## EPILOGO

Come avrete notato, questo libro è diverso. Contiene molte opinioni e suggerimenti, alcuni dei quali possono discostarsi dalle tendenze attuali. Il nostro scopo era proprio questo: offrirvi un'alternativa su varie questioni, tra cui il *lavoro pratico* e la *mentalità*.

Per quanto riguarda il primo punto, i nostri suggerimenti sono piuttosto semplici. "*L'uso di strumenti di tendenza e la loro promozione per attirare i pazienti sono diventati la nuova moda di questi tempi*" - come ha osservato Deepa Sekhar. Noi proviamo a contrapporci a questa tendenza. Le nostre soluzioni tecniche essenziali possono aiutarvi a ottenere risultati paragonabili a quelli dei migliori centri di tutto il mondo.

Per quanto riguarda la seconda, la mentalità, il solito elenco ("obbedire alle regole; eseguire il compito come richiesto; soddisfare tutti i requisiti di forma; non commettere errori") è come l'approccio dei genitori premurosi nei confronti dei loro bambini piccoli e indifesi? Ci si aspetta che gli embriologi forniscano solo relazioni impeccabili e statistiche eccellenti; il nostro suggerimento principale è che la loro responsabilità comprenda anche che assistano alla formazione di embrioni sani e felici.

Tuttavia, dobbiamo sottolineare ancora una volta, ciò che consigliamo qui è solo una proposta, una possibilità. Potreste avere idee, intenzioni, quadri e limiti diversi. Sta a voi decidere se seguire o meno i nostri consigli.

Riferendoci alla dicitura tipica dei Parchi Nazionali Australiani (con una piccola aggiunta): "**La vostra sicurezza** (e il vostro futuro) **è una nostra preoccupazione, ma anche una vostra responsabilità**".

## BIBLIOGRAFIA

Arav A. Vitrification of oocytes and embryos.

In: Lauria A, Gandolfi F (eds) Portland Press, Cambridge, 1992, pp. 255–64.

Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Marjoribanks J, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 May 29;5(5):CD011320. doi: 10.1002/14651858.CD011320.pub4.

Avery B, Greve T. Impact of incubator type on the yield of in vitro produced bovine blastocysts. *Acta Vet Scand.* 1992;33(4):341-8. PMID: 1488949.

Baak NA, Cantineau AE, Farquhar C, Brison DR. Temperature of embryo culture for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Sep 17;9(9):CD012192. doi: 10.1002/14651858.CD012192.pub2.

Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update.* 1995 Mar;1(2):91-148. doi: 10.1093/humupd/1.2.91.

Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 1982 Aug;27(1):147-58. doi: 10.1095/biolreprod27.1.147.

Brison DR, Roberts SA, Kimber SJ. How should we assess the safety of IVF technologies? *Reprod Biomed Online.* 2013 Dec;27(6):710-21. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.09.006.

Capalbo A, Poli M, Rienzi L, Girardi L, Patassini C, Fabiani M, Cimadomo D, Benini F, Farcomeni A, Cuzzi J, Rubio C, Albani E, Sacchi L, Vaiarelli A, Figliuzzi M, Findikli N, Coban O, Boynukalin FK, Vogel I, Hoffmann E, Livi C, Levi-Setti PE, Ubaldi FM, Simón C. Mosaic human preimplantation embryos and their developmental potential in a prospective, non-selection clinical trial. *Am J Hum Genet.* 2021 Dec 2;108(12):2238-2247. doi: 10.1016/j.ajhg.2021.11.002.

Chang MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature.* 1959 Aug 8;184(Suppl 7):466-7. doi: 10.1038/184466a0.

Cheng WTK, Moor RM, Polge C. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology.* 1986 Jan;25:146 (abstract).

Cohen J, Alikani M. The time has come to radically rethink assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.* 2013 Oct;27(4):323-4. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.08.001.

Datta AK, Campbell S, Deval B, Nargund G. Add-ons in IVF programme - Hype or Hope? *Facts Views Vis Obgyn.* 2015 Dec 28;7(4):241-250

Evers JL. The wobbly evidence base of reproductive medicine. *Reprod Biomed Online.* 2013 Dec;27(6):742-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.06.001.

Fausser BC. Towards the global coverage of a unified registry of IVF outcomes. *Reprod Biomed Online.* 2019 Feb;38(2):133-137. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.12.001.

Gatimel N, Moreau J, Parinaud J, Léandri RD. Need for choosing the ideal pH value for IVF culture media. *J Assist Reprod Genet.* 2020 May;37(5):1019-1028. doi: 10.1007/s10815-020-01726-5.

Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Worldwide decline of IVF birth rates and its probable causes. *Hum Reprod Open*. 2019 Aug 8;2019(3):hoz017. doi: 10.1093/hropen/hoz017.

Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brien SJ, Schmidt PM, Wildt DE. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 1988 Sep;39(2):355-72. doi: 10.1095/biolreprod39.2.355.

Harper J, Magli MC, Lundin K, Barratt CL, Brison D. When and how should new technology be introduced into the IVF laboratory? *Hum Reprod*. 2012 Feb;27(2):303-13. doi: 10.1093/humrep/der414.

Harper J, Jackson E, Sermon K, Aitken RJ, Harbottle S, Mocanu E, Hardarson T, Mathur R, Viville S, Vail A, Lundin K. Adjuncts in the IVF laboratory: where is the evidence for 'add-on' interventions? *Hum Reprod*. 2017 Mar 1;32(3):485-491. doi: 10.1093/humrep/dex004.

Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update*. Jul-Aug 2015;21(4):411-26. doi: 10.1093/humupd/dmv016.

Jarvis GE. Early embryo mortality in natural human reproduction: What the data say. *F1000Res*. 2016 Nov 25;5:2765. doi: 10.12688/f1000research.8937.2

Kamath MS, Mascarenhas M, Franik S, Liu E, Sunkara SK. Clinical adjuncts in in vitro fertilization: a growing list. *Fertil Steril*. 2019 Dec;112(6):978-986. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.09.019.

Krisher RL, Wheeler MB. Towards the use of microfluidics for individual embryo culture. *Reprod Fertil Dev*. 2010;22(1):32-9. doi: 10.1071/RD09219

Krisher RL, Schlenker T. Culture of Human Preimplantation Embryos in a Clinical ART Setting. *Methods Mol Biol*. 2019;2006:355-371. doi: 10.1007/978-1-4939-9566-0\_24.

Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod*. 1999 Dec;14(12):3077-9. doi: 10.1093/humrep/14.12.3077.

Landa V, Teplá O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. *Folia Biol (Praha)*. 1990;36(3-4):153-8. PMID: 2257934.

Legro RS, Wu X. Introduction: choosing the main outcome of an infertility trial is harder than you think. *Fertil Steril*. 2014 May;101(5):1201-2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.051.

Lensen S, Shreeve N, Barnhart KT, Gibreel A, Ng EHY, Moffett A. In vitro fertilization add-ons for the endometrium: it doesn't add-up. *Fertil Steril*. 2019 Dec;112(6):987-993. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.10.011.

Ma R, Xie L, Han C, Su K, Qiu T, Wang L, Huang G, Xing W, Qiao J, Wang J, Cheng J. In vitro fertilization on a single-oocyte positioning system integrated with motile sperm selection and early embryo development. *Anal Chem*. 2011 Apr 15;83(8):2964-70. doi: 10.1021/ac103063g.

Macklon NS, Ahuja KK, Fauser B. Building an evidence base for IVF 'add-ons'. *Reprod Biomed Online*. 2019 Jun;38(6):853-856. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.04.005.

Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod*. 1996 May;54(5):1059-69. doi: 10.1095/biolreprod54.5.1059.

- Matsuura K, Uozumi T, Furuichi T, Sugimoto I, Kodama M, Funahashi H. A microfluidic device to reduce treatment time of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2013 Feb;99(2):400-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.10.022.
- Matsuura K. Numerical calculations for diffusion effects in the well-of-the-well culture system for mammalian embryos. *Reprod Fertil Dev*. 2014 Jun;26(5):742-51. doi: 10.1071/RD13025.
- Mori C, Kuwayama M, Okimura T, Aono F, Takehara Y, Kato O. Development of mouse and human embryos in a low-humidity incubator. *Fertil Steril*. 2011;96(3):S2499-50 (abstract).
- Mortimer D, Cohen J, Mortimer ST, Fawzy M, McCulloh DH, Morbeck DE, Pollet-Villard X, Mansour RT, Brison DR, Doshi A, Harper JC, Swain JE, Gilligan AV. Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting. *Reprod Biomed Online*. 2018 Jun;36(6):658-674. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.02.005.
- Nagashima JB, Sylvester SR, Nelson JL, Cheong SH, Mukai C, Lambo C, Flanders JA, Meyers-Wallen VN, Songsasen N, Travis AJ. Live Births from Domestic Dog (*Canis familiaris*) Embryos Produced by In Vitro Fertilization. *PLoS One*. 2015 Dec 9;10(12):e0143930. doi: 10.1371/journal.pone.0143930.
- Niederberger C, Pellicer A, Cohen J, Gardner DK, Palermo GD, O'Neill CL, Chow S, Rosenwaks Z, Cobo A, Swain JE, Schoolcraft WB, Frydman R, Bishop LA, Aharon D, Gordon C, New E, Decherney A, Tan SL, Paulson RJ, Goldfarb JM, Brännström M, Donnez J, Silber S, Dolmans MM, Simpson JL, Handyside AH, Munné S, Eguizabal C, Montserrat N, Izpisua Belmonte JC, Trounson A, Simon C, Tulandi T, Giudice LC, Norman RJ, Hsueh AJ, Sun Y, Laufer N, Kochman R, Eldar-Geva T, Lunenfeld B, Ezcurra D, D'Hooghe T, Fauser BCJM, Tarlatzis BC, Meldrum DR, Casper RF, Fatemi HM, Devroey P, Galliano D, Wikland M, Sigman M, Schoor RA, Goldstein M, Lipshultz LI, Schlegel PN, Hussein A, Oates RD, Brannigan RE, Ross HE, Pennings G, Klock SC, Brown S, Van Steirteghem A, Rebar RW, LaBarbera AR. Forty years of IVF. *Fertil Steril*. 2018 Jul 15;110(2):185-324.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.005.
- Ombelet W. Is global access to infertility care realistic? The Walking Egg Project. *Reprod Biomed Online*. 2014 Mar;28(3):267-72. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.11.013
- Palmer E, Bézard J, Magistrini M, Duchamp G. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl*. 1991;44:375-84. PMID: 1795281
- Parikh FR. Affordable in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2013 Aug;100(2):328-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.049.
- Peura TT, Vajta G. A comparison of established and new approaches in ovine and bovine nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*. 2003;5(4):257-77. doi: 10.1089/153623003772032772.
- Pool TB, Schoolfield J, Han D. Human embryo culture media comparisons. *Methods Mol Biol*. 2012;912:367-86. doi: 10.1007/978-1-61779-971-6\_21.
- Pribenszky C, Mátyás S, Kovács P, Losonczi E, Zádori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online*. 2010 Oct;21(4):533-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.04.015.
- Provoost V, Tilleman K, D'Angelo A, De Sutter P, de Wert G, Nelen W, Pennings G, Shenfield F, Dondorp W. Beyond the dichotomy: a tool for distinguishing between experimental, innovative and established treatment. *Hum Reprod*. 2014 Mar;29(3):413-7. doi: 10.1093/humrep/det463.

- Reed ML, Hamic A, Thompson DJ, Caperton CL. Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. *Fertil Steril*. 2009 Nov;92(5):1783-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.05.008.
- Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod*. 2001 Oct;16(10):2187-94. doi:10.1093/humrep/16.10.2187.
- Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum Reprod Update*. 2011 Jan-Feb;17(1):34-45. doi: 10.1093/humupd/dmq029.
- Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, Scarica C, Farcomeni A, Vajta G, Ubaldi FM. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. *Reprod Biomed Online*. 2015 Jan;30(1):57-66. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.09.012.
- Selman HA, El-Danasouri I. Pregnancies derived from vitrified human zygotes. *Fertil Steril*. 2002 Feb;77(2):422-3. doi: 10.1016/s0015-0282(01)02991-0.
- Sfontouris IA, Martins WP, Nastri CO, Viana IG, Navarro PA, Raine-Fenning N, van der Poel S, Rienzi L, Racowsky C. Blastocyst culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Oct;33(10):1261-1272. doi: 10.1007/s10815-016-0774-5.
- Simón C, Bellver J. Scratching beneath 'The Scratching Case': systematic reviews and meta-analyses, the back door for evidence-based medicine. *Hum Reprod*. 2014 Aug;29(8):1618-21. doi: 10.1093/humrep/deu126.
- Smith GD, Takayama S. Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction. *Mol Hum Reprod*. 2017 Apr 1;23(4):257-268. doi: 10.1093/molehr/gaw076.
- Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, Rall WF, Pitt RE, Lin TT, MacIntyre RJ. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*. 1990 May 10;345(6271):170-2. doi: 10.1038/345170a0.
- Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978 Aug 12;2(8085):366. doi: 10.1016/s0140-6736(78)92957-4.
- Swain JE. Optimal human embryo culture. *Semin Reprod Med*. 2015 Mar;33(2):103-17. doi: 10.1055/s-0035-1546423.
- Swain JE. Controversies in ART: considerations and risks for uninterrupted embryo culture. *Reprod Biomed Online*. 2019 Jul;39(1):19-26. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.02.009.
- Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod Biomed Online*. 2001;3(1):25-29. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61960-8.
- Thouas GA, Jones GM, Trounson AO. The 'GO' system--a novel method of microculture for in vitro development of mouse zygotes to the blastocyst stage. *Reproduction*. 2003 Aug;126(2):161-9. doi: 10.1530/rep.0.1260161.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. The submarine incubation system, a new tool for in vitro embryo culture: a technique report. *Theriogenology*. 1997; 48(8):1379-85.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 1998 Sep;51(1):53-8. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V.

Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. *Mol Reprod Dev*. 2000 Mar;55(3):256-64. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<256::AID-MRD3>3.0.CO;2-7.

Vajta G, Lewis IM, Hyttel P, Thouas GA, Trounson AO. Somatic cell cloning without micromanipulators. *Cloning*. 2001;3(2):89-95. doi: 10.1089/15204550152475590.

Vajta G, Kragh PM, Mtango NR, Callesen H. Hand-made cloning approach: potentials and limitations. *Reprod Fertil Dev*. 2005;17(1-2):97-112. doi: 10.1071/rd04116.

Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J. Embryo culture: can we perform better than nature? *Reprod Biomed Online*. 2010 Apr;20(4):453-69. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.12.018.

Vajta G, Parmegiani L, Machaty Z, Chen WB, Yakovenko SA. Back to the future: optimised micro-well culture of individual human preimplantation stage embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2021 Oct; 38(10):2563-2574, doi: 10.1007/s10815-021-02167-4.

van de Wiel L, Wilkinson J, Athanasiou P, Harper J. The prevalence, promotion and pricing of three IVF add-ons on fertility clinic websites. *Reprod Biomed Online*. 2020 Nov;41(5):801-806. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.07.021.

Whittingham DG. Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature*. 1968 Nov 9;220(5167):592-3. doi: 10.1038/220592a0.

Wilkinson J, Malpas P, Hammarberg K, Mahoney Tsigdinos P, Lensen S, Jackson E, Harper J, Mol BW. Do à la carte menus serve infertility patients? The ethics and regulation of in vitro fertility add-ons. *Fertil Steril*. 2019 Dec;112(6):973-977. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.09.028.

Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerbach A, Nagy A. Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. *Nature*. 1993 Sep 2;365(6441):87-9. doi: 10.1038/365087a0.

Zemyarska MS. Is it ethical to provide IVF add-ons when there is no evidence of a benefit if the patient request it? *J Med Ethics* 2019 May;45(5):346-50. doi: 10.1136/medethics-2018-104983.

## **RINGRAZIAMENTI**

Gli autori desiderano ringraziare tutti - familiari, amici, colleghi, illustratori, editori, tipografi e distributori - per il loro gentile sostegno, sia personale che professionale. Siamo particolarmente grati ai coautori delle edizioni inglese, spagnola, araba, cinese, portoghese e ucraina - rispettivamente Zoltán Macháty, Anabella Marconetto, Sarah Madani, Da Li, Mariana De Nadai, Anastasiia Bogdaniuk - per aver contribuito in modo significativo anche alla versione inglese, con aggiunte, suggerimenti e correzioni.

Dobbiamo un ringraziamento speciale per l'ispirazione, il continuo supporto e l'incoraggiamento alla signora Jenny Lin, CEO di VitaVitro BioTech Co., Ltd. (Shenzhen, Cina) e a tutta l'azienda. Questo libro è uno dei frutti della nostra straordinaria collaborazione degli ultimi sette anni. Proseguiamo a lungo con molti altri futuri risultati insieme!

## AUTORI

### Gábor Vajta

Durante la sua (troppo) lunga vita, Gábor Vajta ha ottenuto due cittadinanze e due soggiorni permanenti, un MD, un PhD e un DSc e quattro cattedre in tre continenti. Tuttavia, non è riuscito a ottenere alcun premio scientifico né alcuna posizione in società scientifiche. È autore o coautore di 152 pubblicazioni con 16.000 citazioni, sei libri e circa 10 capitoli di libri. Ha introdotto alcune nuove tecniche, tra cui la vitrificazione mediante Open Pulled Straw (OPS), la tecnica Handmade Cloning (HMC) e il sistema Well of the Well (WOW). A queste invenzioni sono seguite sei richieste di brevetti, rimasti improduttivi. Ha servito grandi istituzioni in Europa, America, Asia e Australia per 34 anni. Dal 2008 è un uomo libero, consulente in tutto il mondo. È cofondatore e CSO di VitaVitro Biotech Co., Ltd., Shenzhen, Cina. Gábor Vajta vive attualmente a Cairns, nell'Queensland, in Australia, ma (prima e dopo il COVID) trascorre metà dell'anno in diversi laboratori di embriologia animale e umana all'estero.



#### Per ulteriori informazioni

<https://gaborvajta.wixsite.com/gaborvajta>

#### Contatto personale

[gabor.vajta@hotmail.com](mailto:gabor.vajta@hotmail.com)



## Valentina Casciani

Si è laureata in scienze biologiche nel 2001, con il massimo dei voti, all'Università degli Studi di Roma La Sapienza. Dal 2003 al 2006, presso l'Università di Toronto, in Canada, ha lavorato al proprio progetto, su tessuti fetoplacentari umani, per il Dottorato di Ricerca, titolo conseguito a Roma nel 2006. Successivamente, nello stesso anno ha iniziato il suo training nel laboratorio di IVF, a Bruxelles, in Belgio, per poi completarlo a Roma, dove ha continuato a lavorare come embriologa in note cliniche private, collaborando allo stesso tempo alle attività di ricerca. Attualmente, Valentina Casciani vive e lavora a Roma ed è la mamma di due splendidi bambini con cui coltiva la sua passione per la musica, lo sport e la pittura.

