



Società Italiana di Embriologia, Riproduzione e Ricerca

È possibile ottenere ovociti maturi a partire dai follicoli ovarici primordiali nell'uomo?

Un commento sul recente lavoro pubblicato dal gruppo di Edimburgo di Evelyn Telfer a cura di:

Giovanni Coticchio

Raffella Fabbri

Roberto Gualtieri

Francesca Gioia Klinger

Riccardo Talevi

La possibilità di ottenere ovociti maturi, competenti per la fecondazione, sviluppo embrionale e nascite a termini di individui sani, a partire da follicoli primordiali coltivati in situ, è stata raggiunta nel topo 15 anni fa, e dopo anni di ricerche, dal gruppo di Eppig (1,2). Gli studi successivi nell'uomo hanno mostrato come fosse difficile replicare questi risultati nella nostra specie. Il lavoro pubblicato dal team di Evelyn Telfer dell'università di Edimburgo (3), uno dei principali gruppi leader del settore, apre reali possibilità, anche nell'uomo, di ottenere ovociti maturi a partire dalla riserva di follicoli primordiali di biopsie ovariche. Gli stessi autori avevano riportato in passato informazioni parziali su questo studio. Nella sua concezione, il lavoro di Telfer e colleghi non si distingue per originalità. Tuttavia, esso fornisce riscontri numerici di grande importanza per valutazioni in merito all'efficacia dell'approccio metodologico. Sebbene la complessa procedura, che comporta 4 steps successivi di coltura, debba essere sicuramente migliorata, le prospettive aperte da questo importante studio sono numerose. In un futuro prossimo, essa potrà contribuire alla preservazione della fertilità femminile di pazienti oncologiche o affette da patologie autoimmuni, ematologiche o altre patologie che causano menopausa precoce, che come è noto viene oggi effettuata anche nel nostro paese con recentissimi successi crioconservando biopsie ovariche e reimpiantando il tessuto nella paziente dopo le terapie oncologiche e la remissione del tumore (4-6). La procedura della Telfer potrà un domani risolvere il rischio di reimmissione di cellule maligne al rimpianto che può essere particolarmente elevato per alcuni tumori, come in alcuni casi di sarcoma e leucemie. In un futuro sicuramente più lontano potrà essere possibile ottenere ovociti maturi a partire da piccole biopsie ovariche in pazienti infertili che intraprendono la riproduzione assistita.

Esaminiamone i dettagli per capire il potenziale dello studio e le attuali limitazioni da superare. Lo studio è partito dal prelievo di biopsie ovariche da pazienti con età media intorno ai 30 anni durante parto cesareo. Delle prime limitazioni sono quindi rappresentate dal fatto che la

SIERR - Società Italiana di Embriologia, Riproduzione e Ricerca

Segreteria c/o Studio Cutuli - Via Rosmini 34, 95014 Giarre (CT) – T. 348 3713986 - www.sierr.it - segreteria@sierr.it
Sede Legale - Via Rosmini 34, 95014 Giarre (CT) – PI 04654560822

popolazione studiata è relativamente giovane, è fertile, non ha patologie oncologiche o di altra natura, e soprattutto è stato utilizzato tessuto non criopreservato. Nella realtà clinica, le biopsie ovariche vengono criopreservate e scongelate, dopo remissione del tumore, all'atto del reimpianto e non sappiamo se il tessuto criopreservato possa avere le stesse "performances" di quello fresco.

La procedura comprende una coltura in vitro per 21 giorni in 4 steps successivi e, per quanto il calcolo della resa del sistema sulla base dei dati esposti nel lavoro non possa essere preciso, possiamo schematizzare i 4 steps e la relativa resa come segue:

- 1) Coltura di tessuto ovarico con una resa di circa il 10% di follicoli secondari
- 2) Coltura singola di 87 follicoli secondari con una resa di 54 follicoli antrali
- 3) Coltura di 48 complessi cumulo ooforo-ovocita isolati
- 4) Maturazione in vitro di 32 complessi con una resa di 9 ovociti in metafase II.

Da una valutazione più ottimistica, la resa della metodica, in termini di ovociti in metafase II ottenuti a partire dai follicoli primordiali, è di circa l'1%. Molto resta da fare per ottimizzare sia la resa di follicoli secondari che quella di ovociti maturi. È importante sottolineare come il terreno di coltura utilizzato sia "molto semplice", serum free nel primo step, addizionato poi negli steps successivi solo da Activina A e FSH. Un terreno più ricco potrebbe migliorare la qualità e la quantità dei follicoli in accrescimento e degli ovociti ottenuti. Sicuramente sistemi di coltura ottimizzati possono già oggi aumentare di almeno tre volte la resa di follicoli secondari dal tessuto coltivato in vitro nello step 1 (7).

Considerando la sola fase di maturazione, la resa è stata del 28% (9 su 32), ossia la metà di quella normalmente ottenuta nei cicli IVM di PMA. Ciò indica che benché i follicoli sostengano la crescita dell'ovocita, competenze essenziali per la maturazione meiotica non sono contestualmente sviluppate. Tuttavia, non si può escludere che nuovi metodi di maturazione in vitro possano incrementare la resa di questa ultima importante fase dell'ovogenesi (8-10).

Gli ovociti metafase II prodotti nello studio hanno il primo globulo polare di dimensione molto superiore al normale e ciò indica una non completa migrazione del fuso meiotico alla periferia dell'ovocita alla ripresa della meiosi, ovvero una posizione anomala, centrale, della vescicola germinale alla ripresa della meiosi.

Gli stessi autori ammettono che i loro risultati "forniscono una validazione iniziale di un modello di coltura multi-step capace di supportare la propagazione ex vivo di ovociti umani" e che "questo modello ha il potenziale di avanzare la nostra comprensione dell'ovogenesi nell'uomo con particolare riguardo nel trattamento dell'infertilità e nella medicina rigenerativa ma è chiaramente necessario ottimizzarlo". È chiaro che ciò è riferito al fatto che gli ovociti ottenuti abbiano delle chiare anomalie ed è poco verosimile che possano avere una corretta competenza a promuovere lo sviluppo di embrioni normali che esitino in nascite a termine di individui sani.

Altri recenti approcci per la preservazione della fertilità femminile, sui quali diversi gruppi di ricerca stanno lavorando, sono rappresentati dagli studi di ottimizzazione della criopreservazione ovarica (11), di prevenzione dei danni irreversibili indotti dai chemioterapici alla riserva ovarica (12,13) o approcci più futuribili come la possibilità di utilizzare cellule staminali ovogoniali (OSC) per ripopolare le ovaie impoverite di follicoli, o differenziare cellule staminali embrionali (ES) o cellule pluripotente indotte (iPS) in cellule follicolari e ovociti per formare de novo follicoli.

Nonostante resti ancora molto da studiare per raggiungere questi obiettivi, lo studio del gruppo della Telfer apre la reale possibilità che in un futuro non lontano si possa sfruttare la numerosissima riserva di follicoli primordiali dell'ovaio umano per ottenere ovociti maturi competenti alla fecondazione e sviluppo a termine.

Referenze:

- 1) Eppig JJ, O'Brien MJ Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod.* 1996;54:197-207
- 2) O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod.* 2003;68:1682-6
- 3) McLaughlin M, Albertini DF, Wallace WHB, Anderson RA, Telfer EE. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Mol Hum Reprod.* 2018; 24:135-142
- 4) Revelli A, Marchino G, Dolfi E, Molinari E, Delle Piane L, Salvagno F, Benedetto C. Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy. *Fertil Steril.* 2013;99:227-30.
- 5) Paradisi R, Macciocca M, Vicenti R, Rossi S, Morselli-Labate AM, Mastroberto M, Seracchioli R, Fabbri R. New insights in the selection and management of cancer patients applicants for ovarian tissue cryopreservation. *Gynecol Endocrinol.* 2016;32:881-885.
- 6) Fabbri R. <https://www.ilrestodelcarlino.it/bologna/cronaca/gravidanza-chemioterapia-1.3572332>
- 7) Talevi R, Sudhakaran S, Barbato V, Merolla A, Braun S, Di Nardo M, Costanzo V, Ferraro R, Iannantuoni N, Catapano G, Gualtieri R. Is oxygen availability a limiting factor for in vitro folliculogenesis? *PLoS One.* 2018;13:e0192501.
- 8) Franciosi F, Coticchio G, Lodde V, Tessaro I, Modena SC, Fadini R, Dal Canto M, Renzini MM, Albertini DF, Luciano AM. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. *Biol Reprod.* 2014;91:61.
- 9) Sánchez F, Lolicato F, Romero S, De Vos M, Van Ranst H, Verheyen G, Anckaert E, Smits JEJ. An improved IVM method for cumulus-oocyte complexes from small follicles in polycystic ovary syndrome patients enhances oocyte competence and embryo yield. *Hum Reprod.* 2017;32:2056-2068.
- 10) Coticchio G. IVM in need of clear definitions. *Hum Reprod.* 2016;31:1387-9.
- 11) Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, De Stefano C, Ferraro R, Sudhakaran S, Gualtieri R. Successful slush nitrogen vitrification of human ovarian tissue. *Fertil Steril.* 2016;105:1523-1531.
- 12) Rossi V, Lispi M, Longobardi S, Mattei M, Rella FD, Salustri A, De Felici M, Klinger FG. LH prevents cisplatin-induced apoptosis in oocytes and preserves female fertility in mouse. *Cell Death Differ.* 2017;24:72-82.
- 13) Fabbri R, Macciocca M, Vicenti R, Paradisi R, Klinger FG, Pasquinelli G, Spisni E, Seracchioli R, Papi A. Doxorubicin and cisplatin induce apoptosis in ovarian stromal cells obtained from cryopreserved human ovarian tissue. *Future Oncol.* 2016;12:1699-711.