

1. La fecondazione

- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 1951 Oct 20;168(4277):697-8.
- Yanagimachi R. Sperm capacitation and gamete interaction. *J Reprod Fertil Suppl*. 1989;38:27-33. Review.
- Primakoff P, Lathrop W, Woolman L, Cowan A, Myles D. Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. *Nature*. 1988 Oct 6;335(6190):543-6.
- Petit FM, Serres C, Bourgeon F, Pineau C, Auer J. Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. *Hum Reprod*. 2013 Apr;28(4):852-65

Studi sulla descrizione di proteine coinvolte nel legame tra spermatozoo e zona pellucida dell'ovocita

- Saling PM, Lakoski KA. Mouse sperm antigens that participate in fertilization. II. Inhibition of sperm penetration through the zona pellucida using monoclonal antibodies. *Biol Reprod*. 1985 Sep;33(2):527-36.

Studio che ha condotto alla descrizione di proteine coinvolte nella reazione acrosomiale

- Naz RK, Alexander NJ, Isahakia M, Hamilton MS. Monoclonal antibody to a human germ cell membrane glycoprotein that inhibits fertilization. *Science*. 1984 Jul 20;225(4659):342-4.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*. 2005 Mar 10;434(7030):234-8.

Studi sulla descrizione di proteine coinvolte nella fusione con la membrana plasmatica ovocitaria

- Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod*. 2010 Jan;16(1):30-6

Review completa sugli studi riguardanti l'impacchettamento della cromatina degli spermatozoi e il più attuale coinvolgimento di questa peculiare struttura nello sviluppo embrionale

- Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*. 2004 May 13;429(6988):154.

Il gamete maschile non trasferisce all'ovocita solo il suo genoma! Questo ed altri lavori precedenti dello stesso gruppo di autori, hanno iniziato a porre l'attenzione sul ruolo dell'RNA paterno nella fecondazione; argomento oggi molto studiato e che si sta sviluppando con i lavori sui mRNA

- Dale B, Defelice LJ, Ehrenstein G. Injection of a soluble sperm fraction into sea-urchin eggs triggers the cortical reaction. *Experientia* 1985;41:1068-70
- Saundera CM, Larman MG, Parrington J et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002;129:3533-44
- Nomikos M, Kashir J, Swann K et al. Sperm PLC zeta: from structure to Ca²⁺ oscillations, egg activation and therapeutic potential. *FEBS letters* 2013; 22;3609-16

Il meccanismo mediante il quale lo spermatozoo attiva l'ovocita e lo sviluppo embrionale è stato oggetto di intenso studio e controversie nell'ambito della ricerca di base. Erano state individuate due ipotesi alternative, la prima secondo la quale lo spermatozoo legava un recettore dell'olemma e dopo una classica trasduzione del segnale, si aveva un rilascio di secondi messaggeri che mediava l'attivazione dello sviluppo; la seconda che ipotizzava la presenza di un fattore solubile nello spermatozoo rilasciato nell'ovocita alla fusione. Va segnalato che uno dei primi lavori che avvalorava l'ipotesi del ruolo di un fattore solubile dello spermatozoo nella attivazione dello sviluppo è stato pubblicato da Brian Dale (Dale et al., 1985), allora alla Stazione Zoologica di Napoli, nel 1985, ovvero ben 17 anni prima che il gruppo di Saunders e Swann (Saunders et al., 2002) ponesse fine alla controversia dimostrando che una fosfolipasi sperm specific, la PLC zeta, iniettata in quantità equivalenti a quelle contenute in un singolo spermatozoo, è l'iniziatore dello sviluppo embrionale. Oggi sappiamo che diversi casi di ICSI failure in maschi subfertili sono dovuti a deficienze della PLCzeta e possono essere risolti mediante attivazione dell'ovocita con calcio ionoforo dopo l'ICSI

- Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm. Nature 1952; 170:326
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Journal of Reproduction and Fertility 1984; 70:219-28.
- Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biology of Reproduction 1976; 15:471-6

Capacitazione spermatica

2. Coltura e selezione di embrioni

- Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. Cochrane Database Syst Rev 2012;7:CD002118.

La coltura e transfer allo studio di blastocisti producono maggiori percentuali di impianto, ma "cumulative clinical pregnancy rates from cleavage stage (derived from fresh and thaw cycles) resulted in higher clinical pregnancy rates than from blastocyst cycles".

- Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. Hum Reprod 1997;12:1545-1549.

Studio molto semplice, ma ampio e formalmente corretto, sulla relazione tra stadio di sviluppo/morfologia e capacità d'impianto degli embrioni. Tuttora molto attuale.

- Ahlström A, Westin C, Reisner E, Wikland M, Hardarson T. Trophoctoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. Human Reproduction 2011;26:3289-3296.

Anche se retrospettivo, trattasi di uno studio molto ampio "single blastocyst transfer" su un aspetto morfologico importante della blastocisti, ma non sempre adeguatamente considerato.

- Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertility and Sterility* 2013;100:624–630.

Per anni (decenni) è stato raccontato che fosse possibile sottrarre senza conseguenze uno-due blastomeri ad un embrione umano di 8 cellule. Così non è.

- Mantikou E, Youssef MAFM, van Wely M, van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S, Mastenbroek S. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Human Reproduction Update* 2013;19:210–220.

Studio che indica una quasi equivalenza dei terreni di coltura. Non conclusivo, ma suggestivo di importanti riflessioni.

- Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Barnett BD, Madden JD. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Human Reproduction* 2009;24:300–307.

RCT che dimostra l'opportunità (necessità) di effettuare la coltura allo stadio di blastocisti in un'atmosfera a bassa tensione di O₂.

- Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertility and Sterility* 2014;101:656–663.e1.

Il titolo e la dimensione dello studio non richiedono ulteriori commenti.

- Ménézo Y, Guerin JF, Czyba JC (1990) Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 42:301–306
- Ménézo Y, Hazout A, Dumont M et al (1992) Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod* 7(Suppl 1):101–106
- Bongso A, Soon-Chye N, Sathananthan H et al (1989) Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 4:706–713
- Bongso A, Ng SC, Fong CY et al (1992) Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. *Fertil Steril* 58:569–574
- Quinn P, Margalit R (1996) Beneficial effects of coculture with cumulus cells on blastocyst formation in a prospective trial with supernumerary human embryos. *J Assist Reprod Genet* 13:9–14
- Ménézo Y, Sakkas D, Janny L (1995) Coculture of human embryo: factor affecting human blastocyst formation in vitro. *Microsc Res Tech* 32:50–56

I principali lavori sulla co-coltura degli embrioni umani

3. La crioconservazione di gameti ed embrioni

- Smith Au, Polge C. Survival of spermatozoa at low temperatures. Nature. 1950 Oct 21;166(4225):668-9.
- Polge C, Smith Au, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature. 1949 Oct 15;164(4172):666

L'efficienza dell'utilizzo di spermatozoi congelati (sia da eiaculato che da recuperi testicolari/epididimari) in tecniche di PMA è ampiamente dimostrata e, ad oggi, la crioconservazione del seme è ancora la sola opzione clinica per preservare la fertilità maschile (ASCO, linee guida 2013). Tutto, però, è iniziato con gli storici studi sul congelamento del seme, sull'impiego dei crioprotettori

- Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. Nature. 1953 Oct 24;172(4382):767-8
- Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen: report of four cases. Fertil Steril. 1954 Nov-Dec;5(6):520-9.

Le prime gravidanze ottenute con spermatozoi congelati

- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod Biomed Online 2005;11:300-308.

Studio che per primo ha dimostrato il grande potenziale della vitrificazione per la conservazione di oociti umani.

- Edgar DH, Bourne H, Speirs AL, McBain JC. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. Hum Reprod 2000;15:175-179.

Studio disarmante nella sua semplicità ma impeccabile nel dimostrare che la capacità di impianto degli embrioni che sopravvivono intatti al congelamento è inalterata, con buona pace dei fautori dell'assisted hatching degli embrioni congelati.

- Edgar DH, Gook DA. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. Human Reproduction Update 2012;18:536-554.

Analisi estesa e acuta sull'efficacia dei diversi approcci alla crioconservazione. Notare la conclusione che "cleavage stage embryos can be cryopreserved with equal success using slow cooling and vitrification".

- Edgar DH, Karani J, Gook DA. Increasing dehydration of human cleavage-stage embryos prior to slow cooling significantly increases cryosurvival. Reprod Biomed Online 2009;19:521-525.

Studio che dimostra che anche lo slow freezing (in una versione ottimizzata) consente di ottenere percentuali di sopravvivenza elevatissime in embrioni "cleavage stage"

- Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology* 2009;59:75-82.

Studio eseguito sui oociti di topo, ma estremamente pertinente a tutti i protocolli di crioconservazione.

- Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, Colamaria S, Sapienza F, Ubaldi F. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod.* 2010 Jan;25(1):66-73

Studio randomizzato che dimostra che gli ovociti vitrificati hanno la potenzialità di fecondarsi e dare origine a embrioni, al pari degli ovociti trattati "a fresco".

4. La nascita di alcune tecniche relative alla Fecondazione in Vitro

- Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster egg with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biology of reproduction* 1976; 15:467-70
- Yanagida K, Bedford JM, Yanagimachi R. Cleavage of rabbit eggs after microsurgical injection of testicular spermatozoa. *Human Reproduction* 1991;6:277-9

Studi sulla microiniezione spermatica prima dell'era della ICSI

- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997;12:532-541.

Nell'epoca della morfocinetica avanzata, la tecnologia di questo studio fa quasi sorridere. Tuttavia, esso costituisce ancora adesso la descrizione più dettagliata della morfocinetica della fecondazione nella specie umana.

- Rock J, Menkin MF. In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. *Science* 1944;100:105-107.

Semplicemente, il primo resoconto della generazione in vitro di un embrione umano.

- Edwards RG, Donahue RP, Baramki TA, Jones HW. Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1966; 96: 192-200.

La prima evidenza di fecondazione in vitro di ovocita umano, ottenuta a Baltimore da Edwards.

- De Kretzer D, Dennis P, Hudson B, et al. Transfer of a human zygote. *Lancet* 1973; 302: 728-729.

Le prime gravidanze (biochimiche) che hanno indicato la possibilità di impiantarsi per gli embrioni ottenuti con IVF.

- Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet 1978; 2: 366

Il primo bambino nato da fecondazione in vitro, la famosa Louise Brown.

- Lenz S, Lauritsen JG, Kjellow M. Collection of human oocytes for in vitro fertilisation by ultrasonically guided follicular puncture. Lancet 1981; 318: 1163.
- Gleicher N, Friberg J, Fullan N, et al. Egg retrieval for in vitro fertilisation by sonographically controlled vaginal culdocentesis. Lancet 1983; 322: 508-509.

L'introduzione dell'aspirazione ovocitaria con guida ecografica destinata a sostituire la via laparoscopica.

- Trounson A, Leeton J, Besanko M, et al. Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilised in vitro. Br Med J 1983; 286: 835-838.

Il primo report di una gravidanza ottenuta dal trasferimento di un embrione ottenuto da ovocita di donatrice esterna alla coppia

- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature 1983; 305: 707-709.
- Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, et al. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril 1984; 42: 293-296.

Le prime gravidanze (una di gemelli monozigoti) ottenute con la crioconservazione embrionaria

- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet 1986; 327: 884-886.

La prima gravidanza ottenuta con la crioconservazione di ovociti. Si è trattato di gravidanza gemellare. Il tasso riportato di sopravvivenza allo slow freezing era ~ 80%.

- Craft I, McLeod F, Green S, et al. Human pregnancy following oocyte and sperm transfer to the uterus. Lancet 1982; 319: 1031-1033

La prima gravidanza ottenuta dal trasferimento in utero di gameti (GIFT). Del 1985 la notizia della prima nascita ottenuta con la medesima tecnica.

- Devroey P, Braeckmans P, Smits J, et al. Pregnancy after translaparoscopic zygote intra-Fallopian transfer in a patient with sperm antibodies. Lancet 1986; 327: 1329

Il lavoro che ha unito i vantaggi della IVF e della GIFT proponendo il trasferimento intra-tubarico degli zigoti (ZIFT)

- Cohen J, Malter H, Fehilly C, et al. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. Lancet 1988; 332: 162.

La prima descrizione della dissezione parziale della zona pellucida al fine di facilitare la penetrazione dello spermatozoo durante la fecondazione in vitro. Lo sviluppo concomitante della tecnica ICSI ha soppiantato questo approccio.

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17-18.

Una grande rivoluzione nella fecondazione in vitro. Una tecnica scoperta a Bruxelles (anche grazie al caso) e diventata in pochi anni la metodica di riferimento grazie alla quale oggi nasce circa l'1-2% di tutti i bambini.

- Laws-King A, Trounson A, Sathananthan H, Kola I. Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. Fertil Steril 1987; 48: 637-642.
- Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, et al. Pregnancy after transfer of sperm under zona. Lancet 1988; 332: 790.

La prima gravidanza e la prima nascita ottenute con la tecnica di inseminazione dello spermatozoo nello spazio peri-vitellino (SUZI). Tecnica sviluppata per il fattore maschile ha avuto vita breve con l'avvento della ICSI.

- Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, et al. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. Lancet 1988; 1: 347-349.

La nascita della diagnosi genetica pre-impianto. Effettuata per identificare il sesso dell'embrione analizzando sequenza y-specifiche in blastomeri ottenuti dall'embrione con biopsia.

- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, et al. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. Fertil Steril 1991; 55: 109-113.

La prima nascita (di tre gemelle) ottenuta in seguito alla maturazione in vitro degli ovociti da un gruppo coreano. Fu utilizzato il liquido follicolare come medium di maturazione e gli embrioni furono trasferiti in una donna ricevente POF.

- Patrizio P, Silber S, Ord T, et al. Two births after microsurgical sperm aspiration in congenital absence of vas deferens. Lancet 1988; 332: 1362.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, et al. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. Hum Reprod 1995; 10: 148-152.

I report delle prime nascite applicando la ICSI con spermatozoi ottenuti da tecniche microchirurgiche sul testicolo di pazienti azoospermici.

- Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. N Engl J Med 2000; 342: 1919

Una delle prime evidenze sulle potenzialità della fertility preservation applicata con crioconservazione e trapianto autologo di tessuto ovarico.