

APOPTOSI IN OOCITI UMANI NON FECONDATI DOPO ICSI.

L. Bosco[°], G. Ruvolo*, E. Cittadini*, G. Morici[°], F. Curatolo[°], A. Romano[°] e M.C. Roccheri[°].

[°] Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo "A. Monroy", Università degli Studi di Palermo.

* Centro di Biologia della Riproduzione, Palermo.

E' stato dimostrato che eventi apoptotici possono essere presenti nelle cellule del cumulo e negli oociti, ma quale sia il suo ruolo durante la gametogenesi non è stato ancora chiarito. Lo scopo dello studio è quello di verificare l'eventuale presenza di apoptosi in oociti umani non fecondati dopo ICSI (Iniezione IntraCitoplasmatica dello Spermatozoo), nell'ambito della fecondazione assistita. E' noto che le pazienti vengono sottoposte a stimolazione ovarica allo scopo di prelevare un numero significativo di oociti. La maggior parte di tali oociti in condizioni fisiologiche non arriverebbe a maturazione, mentre, per l'induzione ormonale, maturano e possono essere utilizzati per la fecondazione in vitro. Tuttavia, dopo l'inseminazione non tutti gli oociti si fecondano, e inoltre circa il 60% di quelli fecondati non prosegue nello sviluppo, ma si arresta a stadi diversi, non raggiungendo lo stadio di blastocisti, stadio di sviluppo maggiormente utilizzato per favorire l'impianto in utero. Pertanto ci si è proposti di accertare se la non avvenuta fecondazione possa essere causata da un evento apoptotico, programmato in precedenza, o, alternativamente, indotto da stress causato dalle procedure di fecondazione assistita (PMA).

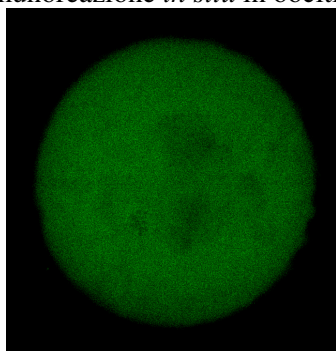
METODOLOGIA: Lo studio è stato effettuato utilizzando, dopo consenso informato, oociti umani che in vitro risultavano non fecondati dopo 48 ore dall'inseminazione, e pertanto destinati all'eliminazione. Per l'esigua quantità del materiale reperito, sono state impiegate esclusivamente analisi in situ. Pertanto gli oociti sono stati saggiati per TUNEL, che rivela le singole cellule con in corso un processo apoptotico; ulteriori indagini sono state condotte mediante immunoreazione con un anticorpo specifico, la caspase-3, in grado di rilevare l'attività dell'enzima responsabile della fase effettrice del processo apoptotico.

RISULTATI e CONCLUSIONI: L'apoptosi, riscontrata con i metodi sopra descritti, in oociti non fecondati dopo le normali procedure di fecondazione assistita, ha fornito importanti informazioni circa la mancata fecondazione ovocitaria, imputabile ad una condizione "intrinseca" degli oociti. Inoltre ha messo in luce che talvolta la responsabilità della non avvenuta fecondazione può essere causata dall'utilizzo di spermatozoi in apoptosi, anche se selezionati per un'apparente buona qualità.

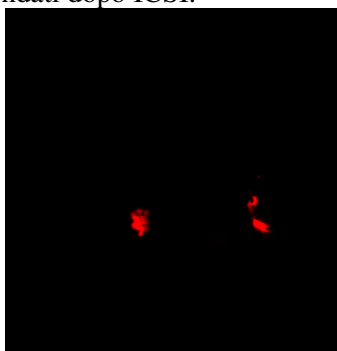
Lo studio sta proseguendo con ulteriori indagini in cellule del cumulo e della granulosa, per appurare se esiste una correlazione tra l'apoptosi riscontrata in questi tipi di cellule e la mancata fecondazione dell'oocita corrispondente, in quanto una legge, approvata nel febbraio 2004, vieta l'utilizzo anche degli oociti destinati all'eliminazione.

1. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Dev.* 2004 Oct;50(5):493-514.
2. In vitro effects of inhibin on apoptosis and apoptosis related proteins in human ovarian granulosa cells. *Endocr Regul.* 2004 Jun;38(2):51-5.
3. Colocalization of DNA fragmentation and caspase-3 activation during atresia in pig antral follicles. *Anat Histol Embryol.* 2004 Feb;33(1):23-7.

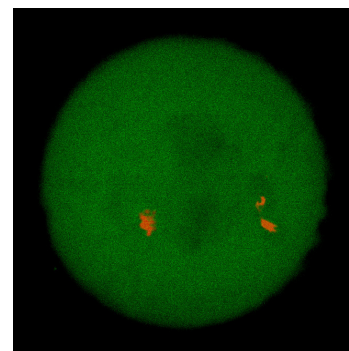
Immunoreazione *in situ* in oociti non fecondati dopo ICSI:



Caspasi 3 cleaved



Propidio ioduro



Sommatoria