

LA VITA NEL GHIACCIO

Carlo CIROTTO

Pur essendo ben consapevole di quanto sia poco elegante iniziare questa relazione con un ricordo personale, tuttavia mi risolvo a farlo per la rilevanza che esso ha sull'argomento che mi avvio ad approfondire. Di ciò, comunque, chiedo venia fin d'ora.

Quando, da giovane, iniziai a fare ricerca sulle emoglobine degli embrioni precoci di uccello, restai meravigliato dal fatto che, nei laboratori che frequentavo, per ogni esperimento venivano usate emoglobine preparate di fresco. Ciò, evidentemente, comportava un lavoro preventivo, lungo e ripetitivo, di allevamento e preparazione degli embrioni, di estrazione del sangue e di lisi dei globuli rossi.

Pensai allora - e la considerai un'idea geniale! - che avrei risparmiato tempo e lavoro se avessi preparato e conservato a -80°C scorte di emoglobine sufficienti per più esperimenti in modo da averle sempre disponibili nella quantità desiderata. Misi in atto il mio proposito ma restai profondamente deluso nel constatare che le famiglie di emoglobine, che ero solito osservare nelle preparazioni fresche, non erano più le stesse: comparivano tipi molecolari sconosciuti e anche le proprietà funzionali di quelli noti risultavano sensibilmente cambiate. Evidentemente, anche se conservate a basse temperature, le molecole avevano subito modificazioni strutturali tali che, se avessi continuato ad usarle per le mie ricerche, non avrei studiato che degli artefatti. Si possono ben immaginare le conseguenze di quell'esperimento sul mio futuro lavoro di ricercatore: avrei trascorso parte consistente del mio tempo ad allevare embrioni ed estrarre sangue ed emoglobine fresche per ogni esperimento.

Quella appena narrata non è soltanto la confessione nuda e cruda di un fallimento ma anche la risposta ad una domanda che, ai fini delle nostre considerazioni, è di importanza fondamentale: può il congelamento

modificare le strutture molecolari dell'embrione? La risposta, dettata dalla mia stessa esperienza, non può essere che positiva: alle componenti molecolari delle cellule embrionali il congelamento provoca modificazioni strutturali tanto profonde da comprometterne la corretta funzionalità.

Dopo questa prima confessione autobiografica, che è anche un punto fermo da cui intendo partire, la mia relazione proseguirà seguendo quattro piste. La prima consisterà nella rivisitazione della struttura cellulare degli esseri viventi e delle loro componenti subcellulari fino al livello delle singole macromolecole. Nella seconda prenderò in esame che cosa significhi, dal punto di vista fisico, il processo del congelamento. La terza pista riguarderà la descrizione delle tecniche attualmente più utilizzate per congelare cellule ed embrioni. La quarta, infine, sarà un breve percorso descrittivo dei progressi nella crioconservazione di cellule uovo ed embrioni.

Cellule

I tulipani, i gatti, gli uomini e in genere tutti gli esseri viventi di cui è ricca la nostra esperienza quotidiana sono organismi pluricellulari, costituiti cioè da un numero elevatissimo di cellule che sono organizzate a formare comunità ordinate e straordinariamente efficienti. Le cellule – va opportunamente ricordato – non sono ‘i mattoni della vita’, come è scritto in molti libri divulgativi e persino in alcuni testi scolastici ed universitari. I mattoni usati in edilizia, infatti, sono corpi duri, inerti, incapaci di adattamento, privi di funzionalità autonoma che non sia quella di far massa. Le cellule, al contrario, sono esseri viventi sotto tutti i punti di vista, con un proprio ciclo vitale compreso tra la nascita e la morte, un proprio modo di interagire con l'ambiente, di comunicare tra loro, di riprodursi. Ciò significa che, se si ha a cuore la correttezza del discorso, un organismo pluricellulare come il nostro corpo va considerato come una società o, meglio, una comunità di altrettanti esseri viventi, ognuno dei quali è in possesso di una propria autonomia. E

così, la diversità dei tessuti rispecchia la diversità dei tipi cellulari che li compongono mentre la diversità degli organi risulta dalla diversa organizzazione dei vari tipi di tessuti che contribuiscono a strutturarli. Utilizzando la terminologia sociologica moderna potremmo affermare che quella delle cellule è una società di individui 'solidali', strutturata secondo i criteri della 'sussidiarietà'.

Le moderne tecniche di microscopia elettronica e soprattutto i risultati di innumerevoli e raffinate ricerche di biochimica e di biologia molecolare dimostrano che le cellule sono, esse stesse, degli organismi, cioè complesse organizzazioni di parti ancor più piccole – gli 'organuli cellulari' – che sono costituiti, a loro volta, da macromolecole interagenti secondo precisi criteri strutturali e funzionali. In breve, ogni cellula è un organismo in miniatura di complessità sicuramente non inferiore a quella degli organismi macroscopici ai quali siamo abituati.

Come avviene negli organismi che è possibile osservare ad occhio nudo, anche al livello cellulare la presenza dell'acqua è significativa ed importante. Non sono lontani i tempi in cui le cellule venivano considerate come vescicole piene di una soluzione acquosa di molecole organiche e inorganiche. Oggi, abbandonata questa generica affermazione, siamo in grado di descrivere con precisione incredibile come sono organizzate nello spazio le macro-molecole cellulari ma continuiamo ad affermare la straordinaria importanza del solvente acqua.

Le analisi dicono che nei tessuti umani la quantità di acqua va dal 20% delle ossa all'85% delle cellule cerebrali. Circa il 70% del nostro peso corporeo, quindi, è dovuto all'acqua. Nelle cellule embrionali la quantità di acqua è di parecchio più alta: sale fino al 95%. Ciò fa sì che la loro consistenza sia simile è quella di una gelatina molto morbida, assai simile alla consistenza delle meduse. Forse non tutti hanno avuto un'esperienza tattile o visiva delle meduse vive che nuotano in acqua; credo però che tutti abbiano potuto osservare che cosa avviene al corpo delle meduse dopo che sono state gettate sulla spiaggia da una mareggiata: entro breve tempo, al

sole e all'asciutto l'acqua evapora e, al posto del corpo molle e voluminoso della medusa non rimane che un velo sottilissimo di materiale organico. Tale osservazione rende plasticamente l'idea della grande quantità d'acqua presente nelle cellule e nei tessuti della medusa che non è dissimile da quella che si trova nelle cellule e nei tessuti embrionali.

Una cellula embrionale somiglia, quindi, molto da vicino ad una gocciolina d'acqua resa appena più densa da un reticolato interno di macromolecole biologiche – soprattutto proteine – che si estende per tutto il suo volume. L'acqua, dal canto suo, non ha proprietà uniformi. In ambito cellulare, le molecole di acqua formano due diverse popolazioni. Alcune vanno a costituire la cosiddetta 'acqua di idratazione', mentre le rimanenti formano 'l'acqua di riempimento'.

L'acqua di idratazione è costituita da molecole altamente ordinate, strettamente addossate alle macro-molecole biologiche, rappresenta circa il 40% dell'intero patrimonio idrico cellulare ed è l'acqua strettamente necessaria al funzionamento dei principali componenti molecolari della cellula.

Le molecole dell'acqua di riempimento mostrano, al contrario, un marcato disordine. Anche se non direttamente implicata nel funzionamento delle macromolecole biologiche, l'acqua di riempimento è impegnata in fenomeni la cui importanza, nell'ambito dell'intera economia cellulare, è tutt'altro che trascurabile. Le molecole d'acqua, allora, non sono da considerare ospiti inerti della cellula ma elementi indispensabili alla sua stessa vita. Sottraendo l'acqua alla cellula, se ne provoca la morte.

L'acqua

L'acqua è una piccola molecola inorganica estremamente interessante. Tutti sanno ripetere la sua formula bruta, H_2O , ma le sue proprietà più importanti possono essere colte solo tenendo presente la sua struttura

spaziale. I due atomi di idrogeno sono legati, ognuno indipendentemente, all'atomo di ossigeno e con esso formano un angolo di $104,5^\circ$. Questa particolare disposizione nello spazio conferisce polarità elettrica alla molecola che si riflette nelle interazioni con le molecole circostanti. Le cariche positive che si addensano sugli idrogeni e la carica negativa che si addensa sull'ossigeno, infatti, fanno sì che le molecole d'acqua tendano ad organizzarsi nello spazio in modo che gli idrogeni positivi si dispongano in vicinanza degli ossigeni negativi, secondo il principio dell'attrazione delle cariche di segno opposto. Quando l'acqua è allo stato liquido, le molecole possiedono energia sufficiente a superare tali forze elettrostatiche e riescono perciò a muoversi in maniera relativamente indipendente, ma quando la temperatura si abbassa al di sotto dello 0, l'energia termica non è più sufficiente a mantenere il libero movimento molecolare e prendono il sopravvento le forze elettrostatiche che obbligano le molecole ad assumere posizioni ordinate nello spazio, quello che in gergo viene detto 'reticolo cristallino'. Si forma così l'acqua solida, cioè il ghiaccio.

La trasformazione dell'acqua liquida in ghiaccio presenta due aspetti particolarmente rilevanti. Il primo è che l'acqua allo stato solido occupa un volume maggiore della stessa acqua che si trova allo stato liquido. Quante volte ci è capitato di dimenticare una bottiglia d'acqua o, peggio, di spumante nel freezer di casa e trovare il vetro spaccato! Il secondo aspetto rilevante è la forma particolare dei cristalli di ghiaccio: assomigliano ad aghi, sottili ed allungati.

Queste due caratteristiche del ghiaccio influenzano profondamente il processo di congelamento dei materiali biologici che siamo interessati ad esaminare.

Nella manualità di un laboratorio biologico o medico si presenta spesso l'esigenza di congelare cellule o altro materiale biologico. Vediamo, allora, che cosa accade quando l'acqua si trasforma in ghiaccio all'interno o all'esterno di cellule vive. La prima delle conseguenze è legata all'aumento di volume dell'acqua interna della cellula che, ghiacciando, costringe la

membrana cellulare a tendersi e infine a rompersi. L'organizzazione cellulare viene, così, definitivamente compromessa. Anche la struttura aghiforme dei microcristalli di ghiaccio non è da meno in quanto a capacità dirompente: la crescita dei cristalli provoca lacerazioni irrimediabili sia alla membrana cellulare che agli organuli che presiedono alla corretta fisiologia della cellula.

Negli anni '70 del secolo scorso fu descritta una tecnica di congelamento tanto lento da lasciare il tempo all'acqua di fluire dall'interno all'esterno della cellula prima di trasformarsi in ghiaccio. I risultati però furono tutt'altro che soddisfacenti perché i cristalli di ghiaccio, crescendo, laceravano la membrana cellulare, questa volta dall'esterno.

Evidentemente, lo scopo di preservare con le basse temperature la vita e la funzionalità delle cellule non poteva essere raggiunto abbassando, tout court, la temperatura.

Tecniche di crioconservazione

La formazione dei cristalli di ghiaccio può essere impedita, o comunque limitata, aggiungendo dei 'crioprotettori' al mezzo di coltura delle cellule. I crioprotettori sono le sostanze note al grande pubblico con il nome di 'antigelo', largamente utilizzate negli impianti idrici sia domestici che industriali per evitare la formazione di ghiaccio e il conseguente danneggiamento delle installazioni.

Utilizzando crioprotettori di bassa tossicità come il 'dimetilsolfossido', il 'saccarosio' o il 'glicole etilenico' è possibile impedire la formazione del ghiaccio anche nei campioni biologici conservati alla bassissima temperatura dell'azoto liquido (-196°C). È stato l'impiego di queste sostanze a spianare concretamente la via alla crioconservazione dei materiali biologici.

All'inizio degli anni '80 fu ripresa la tecnica del congelamento lento descritta nel decennio precedente e fu modificata con l'introduzione di

crioprotettori a bassa concentrazione. I risultati furono soddisfacenti e nel 1983 fu annunciato il primo esito positivo di gravidanza seguita all'impianto di un embrione congelato con questa tecnica.

Tale metodica non tardò ad essere adottata su vasta scala e, a causa dei buoni risultati, subì ben poche modifiche con il passare del tempo. Anche al giorno d'oggi è quella più largamente utilizzata nei laboratori biologici specializzati. Ovviamente, se la lentezza è il requisito critico dell'abbassamento della temperatura, la lentezza dello scongelamento e del ritorno alla temperatura fisiologica lo è altrettanto. La tecnica del congelamento lento prevede infatti uno scongelamento altrettanto lento, unito all'allontanamento dei crioprotettori.

Nel decennio seguente fu sviluppata una nuova metodica, alternativa a quella del congelamento lento, a cui fu dato il nome di 'vitrificazione' perché capace di conferire all'acqua dei campioni biologici la consistenza altamente viscosa tipica dei vetri. È noto che i vetri non possono essere considerati dei solidi essendo privi di struttura cristallina. Le loro componenti molecolari sono disposte in maniera disordinata come in un liquido ma sono in possesso di un alto grado di viscosità che li fa apparire simili ai solidi. Con la tecnica della vitrificazione vengono così scongiurati i pericoli della formazione dei cristalli di ghiaccio.

La vitrificazione si ottiene utilizzando procedure che sono l'opposto di quelle seguite nel congelamento lento: il raffreddamento è ultra-rapido ed è fatto avvenire in presenza di concentrazioni di crioprotettori estremamente elevate (si giunge anche a concentrazioni 6M !). Anche lo scongelamento prevede tempi molto brevi.

Il metodo per ottenere processi tanto veloci è quanto mai semplice ed immediato. Un anellino di plastica viene immerso nella sospensione di cellule o di embrioni da congelare e viene subito estratto. A causa della tensione superficiale un velo di liquido si stende tra i bordi dell'anellino e vi è una certa probabilità che in esso sia contenuto il campione biologico da vitrificare. Dopo essersi assicurati della sua presenza, il tutto viene immerso

direttamente in azoto liquido che si trova alla temperatura di -196°C e così resta conservato.

Contrariamente a quanto avvenuto per il congelamento lento, il protocollo di vitrificazione ha subito nel tempo diversi cambiamenti significativi. Le prime modifiche hanno avuto lo scopo di ridurre la concentrazione dei crioprotettori, potenzialmente tossici per le cellule; altre, successive, sono state finalizzate a ridurre il volume del campione. Tutto ciò ha portato alla varietà dei protocolli descritti attualmente in letteratura (Cryostraw, Cryoloop, Cryotop) e applicati, con vario successo, agli embrioni di molte specie di mammiferi, incluso l'uomo.

La prima gravidanza portata a termine felicemente dopo l'impianto di un embrione vitrificato è stata riportata in un lavoro scientifico del 2001. Al giorno d'oggi la vitrificazione è sempre più utilizzata nella crioconservazione di embrioni precoci e di blastocisti di molte specie di mammiferi, compreso l'uomo, e un numero sempre crescente di centri specializzati in tecnologie riproduttive lo adotta per queste sue caratteristiche:

- (a) gli embrioni danneggiati dal trattamento sono praticamente inesistenti,
- (b) la percentuale di sopravvivenza degli embrioni trattati è assai vicina a quella degli embrioni non trattati,
- (c) le percentuali di attecchimento, di gravidanza e di nascite vive sono mediamente più alte di quelle del congelamento lento,
- (d) i costi sono sensibilmente inferiori a quelli del congelamento lento.

Nonostante che in letteratura sia presente un gran numero di pubblicazioni scientifiche su questo argomento, sono decisamente pochi gli studi che presentano un'adeguata ampiezza d'indagine e le necessarie garanzie statistiche. È illuminante al riguardo l'indagine condotta dal gruppo di Abdel Hafez nel 2010. Delle 2.700 pubblicazioni esaminate solo 6 mostravano caratteristiche di completezza, accuratezza ed elaborazione statistica e solamente in 4 di esse venivano messi a confronto i risultati della vitrificazione con quelli del congelamento lento. I 4 studi comunque erano concordi nel rilevare la superiorità della vitrificazione per quel che riguarda la

sopravvivenza degli embrioni mentre solo due la consideravano superiore per quel che riguarda la percentuale degli attecchimenti e delle gravidanze.

Applicazioni

Nei centri specializzati in tecnologie riproduttive si fa largamente ricorso a metodiche che prevedono la disponibilità iniziale di parecchi ovociti in modo da utilizzarne alcuni da affreschi per la fecondazione e conservare i rimanenti per successivi interventi qualora i primi non abbiano dato i risultati desiderati. Il metodo di elezione per la conservazione delle cellule uovo dovrebbe essere, è ovvio, il congelamento. Il condizionale è d'obbligo perché a congelare le cellule uovo senza comprometterne struttura e funzionalità si incontrano difficoltà non indifferenti.

Le cellule uovo, infatti, a differenza degli spermatozoi, hanno un contenuto d'acqua particolarmente elevato e, come se ciò non bastasse, possiedono la caratteristica tipica delle cellule sessuali non ancora mature: una straordinaria abbondanza di strutture micro-tubulari, le così dette 'fibre del fuso'. Infatti le uova, quando lasciano l'ovario, non hanno ancora raggiunto la completa maturazione che verrà acquisita solo con l'ingresso dello spermatozoo nella fecondazione.

Come fa ben intendere lo stesso nome, i microtubuli sono strutture proteiche di forma tubulare piene di una soluzione acquosa ed immerse nel liquido citoplasmatico. Si può ben immaginare, quindi, quale effetto rovinoso abbia il congelamento dell'acqua al loro interno e si possono altrettanto facilmente immaginare i riflessi negativi che ciò comporta sulla capacità delle uova di essere fecondate e di produrre embrioni normali.

Se i risultati che si ottengono con la tecnica del congelamento lento sono abbastanza sconcertanti per i motivi ora esposti, le prospettive sembrano migliorare con la vitrificazione. Diverse ricerche indicano la superiorità di questa tecnica rispetto al congelamento lento sia per l'alto tasso di

sopravvivenza degli ovociti sia per la loro capacità di essere fecondati e di dar origine ad embrioni che presentano un normale sviluppo in vitro. A livello cellulare, inoltre, gli ovociti vitrificati mostrano una migliore integrità strutturale e un più alto grado di allineamento cromosomico se confrontati con quelli sottoposti a congelamento lento.

La difficoltà ad ottenere buoni risultati nel congelamento delle cellule uovo non è stata senza conseguenze sotto il profilo etico. Si è preferito infatti congelare gli embrioni precoci invece che le cellule uovo. Le difficoltà nel congelamento degli embrioni sono, infatti, minori, legate alla grande ricchezza di acqua più che alla massiccia presenza dei microtubuli.

È interessante notare che anche nel caso degli embrioni la vitrificazione dà risultati migliori del congelamento lento anche se embrioni a stadi diversi di sviluppo richiedono l'introduzione di opportune variazioni tecniche. Non è difficile far risalire tali diversità di approccio alla diversa ricchezza d'acqua delle cellule. È esemplare, al riguardo, il trattamento richiesto dalle blastocisti, che sono particolarmente ricche d'acqua a motivo della loro struttura cava (il 'blastocelo') piena di liquido. Prima di procedere alla vitrificazione, è necessario asportare dal blastocelo il liquido che lo riempie e ciò può essere fatto o meccanicamente con una micro-siringa o, in maniera più sofisticata, con un trattamento laser. I risultati descritti in letteratura sembrano promettenti: le percentuali di attecchimento sfiorano il 60%.

Come si può facilmente dedurre da tutto ciò che è stato detto, il metodo del congelamento lento, che è tuttora il più largamente utilizzato, è stato affiancato in molti laboratori dalla vitrificazione, metodo più semplice e, stando ai primi risultati, capace di migliori risultati. Certo, saranno necessari ulteriori approfondimenti di tipo sistematico e più ampie indagini statistiche prima che possa essere formalizzato in protocolli ai quali ricorrere in tranquillità. Non sono pochi gli esperti del settore pronti a scommettere che ciò avverrà entro breve tempo.

Mi piace chiudere questo mio intervento con una nota di speranza. I risultati incoraggianti ottenuti dalla vitrificazione delle cellule uovo potranno,

in un futuro non molto lontano, salvare dalla morte fredda molti e molti embrioni.