

# Optimizing Human



## And Embryo Freezing

13 giugno 2014

### Crioconservazione spermatozoi

*Caterina De Leo*

U.O. Clinica Ostetrica e Ginecologica

Laboratorio Andrologia e Crioconservazione

IRCCS A.O.U. San Martino-IST Genova

# PERCHE' SI CRIOCONSERVA

- Per prevenire la sterilità:
  - in pazienti che devono essere sottoposti a terapie con possibile effetto gonadotossico
  - in pazienti con progressivo deterioramento del liquido seminale
  - in pazienti che vanno incontro ad interventi chirurgici in cui possa essere lesa la funzione eiaculatoria

# PERCHE' SI CRIOCONSERVA

- Pazienti che effettuano vasectomia
- Pazienti esposti a sostanze dannose per motivi professionali
- Pazienti che, per ragioni psicologiche o logistiche, hanno difficoltà a raccogliere nel giorno della fecondazione assistita

# PERCHE' SI CRIOCONSERVA

- Pazienti paraplegici in cui il recupero avviene tramite elettrostimolazione o somministrazione di farmaci specifici
- Pazienti che necessitano di recupero chirurgico degli spermatozoi

# COSA SI CONSERVA

- Liquido seminale
- Prelievi bioptici testicolari
  - PESA (aspirazione percutanea da epididimo)
  - TESA (aspirazione da testicolo)
  - TESE
  - Micro-TESE

- In quest'ultimo caso, un profilo ormonale precedente l'intervento può dare utili indicazioni sulla probabilità di successo del recupero (dosaggio FSH e inibina B)

# REQUISITI PER L'ACCESSO ALLA BANCA

- *Età*: non ci sono limiti, ma un'età molto giovane o avanzata rappresenta un fattore sfavorevole rispetto alla qualità della crioconservazione
- *Terapia non ancora avviata*:
  - non si effettua crioconservazione se la terapia ha già avuto inizio

- PROPORRE LA  
CRIOCONSERVAZIONE  
DEL LIQUIDO SEMINALE?



- **Adeguate informazione dei clinici**

Se possibile prima di un eventuale intervento

Se possibile prima di terapie di qualsiasi tipo

- **Compliance del paziente**

Paziente minorenne

# REQUISITI PER L'ACCESSO ALLA BANCA

Sierologia - Markers infettivologici:

- Epatite B: anticorpi anti-HBsAg e anti-core
- Epatite C: anticorpi anti-HCV
- HIV: anticorpi anti-HIV
- Citomegalovirus: IgM e IgG
- VDRL-TPHA

Non si può conservare in assenza di indagine sierologica: si può fare eccezione in urgenza e solo in possesso di una banca di transizione

# REQUISITI PER L'ACCESSO ALLA BANCA

...in presenza di positività di uno dei primi tre markers non è possibile crioconservare liquido seminale o prelievi bioptici, a meno di non possedere banche dedicate per ciascun tipo di marker. Per positività alle IgM per CMV bisogna attendere, se possibile, la loro negativizzazione

- Alcuni giorni di astinenza come per lo spermioγραμμα: non ci sono limiti in caso di urgenza
- Raccolta per masturbazione da effettuarsi presso il Centro per motivi legali: sono previste eccezioni per pazienti paraplegici, cateterizzati o degenti
- Contenitore sempre contrassegnato con nome, cognome e data di nascita
- Se possibile, più raccolte

# ASPETTI FORMALI

- Accertamento dell'identità del paziente (fotocopia del documento di identità): se il paziente è minorenne, sono necessari anche firma e documento dei genitori o di chi esercita la potestà genitoriale
- Consenso informato
- Dichiarazione di manleva
- Copia degli esami infettivologici

# ASPETTI FORMALI

## Fascicolo personalizzato

- dati personali e anamnestici, consenso informato, dichiarazioni di manleva, copia del documento di identità e degli esami sierologici
- riassunto delle raccolte con la valutazione qualitativa del singolo campione e numero di paillettes/vials ricavati
- tracciabilità dei materiali impiegati
- localizzazione di ogni singolo dispositivo nel contenitore banca

Inserimento nel database

# ASPETTI FORMALI

Il paziente deve effettuare annualmente la richiesta di prosecuzione del deposito

Il paziente può effettuare il ritiro parziale o completo del proprio deposito oppure richiederne l'eliminazione

Per ognuno di questi step sono necessari la presenza del paziente, la presentazione del documento di identità e un consenso scritto

# ASPETTI FORMALI

- La crioconservazione ha una durata temporale definita (per esempio, un anno). Al termine di tale periodo, in mancanza di una richiesta esplicita per il rinnovo, il Centro è autorizzato ad eliminare il campione
- Poiché le paillettes possono essere ritirate solo dal proprietario dei gameti, eventuali richieste post-mortem non possono essere evase ed il campione crioconservato sarà eliminato alla scadenza prevista sul consenso



# ASPETTI TECNICI

- Terreno crioprotettivo
  - Congelamento rapido
  - Congelamento lento
- Attrezzature criogeniche (in stanza adeguatamente attrezzata)

# ASPETTI TECNICI

- Dispositivi per la conservazione
  - Paillettes termosaldabili ad alta sicurezza, con marcatura indelebile o etichettatura con codice a barre, da riempire mediante appositi raccordi (volume 0,2-0,5 ml)
  - Vials
  - Microgocce in capsule di Petri
  - Cryoloop
  - Pipette da ICSI

# ASPETTI TECNICI

- Sorveglianza computerizzata del livello di azoto (allarme remoto)
- Disinfezione periodica dei contenitori
- Check semestrale dei depositi
- Contenitori criogenici di trasporto

# ASPETTI TECNICI

- Modalità di trattamento delle biopsie testicolari:
  - Valutazione microscopica a fresco in sala durante l'intervento
  - Frazionamento sterile dei frammenti bioptici mediante vetrini portaoggetto
  - Incubazione a 37°C in terreno Sperm Medium o altro adeguato a sostenere la vitalità degli spermatozoi
  - Separazione del sovrinatante dalla frazione cellulare
  - Lavaggio, valutazione numerica approssimativa e crioconservazione, eventualmente prova di vitalità

# TESSUTO TESTICOLARE IN SOGGETTI PREPUBERI

- Slow freezing: scarso recupero e mancata differenziazione
- Vittrificazione: recupero e differenziazione degli spermatogoni

# BANCA DEL SEME

# IRCCS A.O.U. SAN MARTINO- IST

- Laboratorio di Andrologia e Crioconservazione

DINOGLMI, Università di Genova

Direttore: prof. Pierluigi Venturini

Caterina De Leo, Angela Di Vinci

Enzo Boccignone, Camilla Rizzo

- Fisiopatologia della Riproduzione Umana

Responsabile: dott.ssa Paola Anserini

# BANCA DEL SEME IRCCS A.O.U. SAN MARTINO- IST

- Centro Cellule Staminali e Terapia Cellulare  
—  
IRCCS A.O.U. San Martino-IST
  - Biologa: dott.ssa Silvia Luchetti
  - Tecnico: Alberto Serio

# DIAMO I NUMERI

- Depositi ottobre 2004 – maggio 2014  
(numero pazienti)

576

- Congelamenti effettuati

949

- Numero di paillettes

circa 5000



# DIAMO I NUMERI

Principali patologie per cui si conserva

Criptospermia - Linfoma H/NH - K testicolare

K colon, K prostatico, Leucemie, K encefalo,  
K polmonare, K rinofaringe, K timo, K tiroide,  
Seminomi, Sarcomi, SLA, Artrite psoriasica,  
un caso di Klinefelter

Azoospermie ostruttive/secretive

# DIAMO I NUMERI

42 BIOPSIE TESTICOLARI:

TESE (38) microTESE (4)

Clinica Urologica, Università di Genova

Direttore: prof. Giorgio Carmignani

dott. Marco Di Pierro

26 biopsie utilizzate per fecondazione assistita (a fresco e dopo crioconservazione):

9 gravidanze evolutive, 7 a termine, 11 nati

# BIOPSIE TESTICOLARI

- Azoospermia ostruttiva 15
- Azoospermia secretiva 9
- Criptospermia 6

# DIAMO I NUMERI

Percentuale di utilizzo del seme  
crioconservato

In letteratura: 2,6 – 13,9%

Nostri dati 8,4%

Dipende dall'età dei pazienti e dal motivo  
della crioconservazione

# GRAZIE

