



Ospedale Evangelico Internazionale

Ente Ecclesiastico Civilmente Riconosciuto
Sede Legale: Sal. Sup. S. Rocchino, 31a - 16122 Genova
Presidio Ospedaliero di Genova Voltri
Piazzale Gianasso, 4 - 16158 - Genova

Optimizing Human Gamete and Embryo Freezing



Crioconservazione Ovociti

- *Marta Cervi* -



Az. Osped. "S. Maria degli Angeli" - Pordenone
S.O.S. di Fisiopatologia della Riproduzione Umana
e Banca del Seme

Responsabile: Dott. F. TOMEI

Responsabile Lab PMA: Dottor. M. MANNO



OVOCITI



Umani MATURI (MII)

UMANI IMMATURI:
+ integrità fuso e allineam cromosom
+ poliploidie ed aneuploidie
- Risultati Vantaggiosi con la crioconservaz degli stessi maturi dopo IVM (2009-2013) → maturation rate

OVOCITI
umani maturi

STORIA

CRITICITÀ

APPLICAZIONI



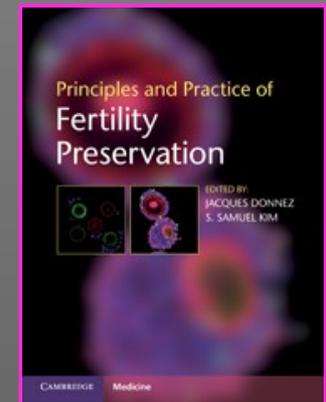
**Principio e
TECNICHE**

RISULTATI

.. DA PIÙ DI 40 ANNI
DIFFERENTI TECNICHE DI CRIOCONSERVAZIONE SONO STATE
applicate agli OVOCITI ...

“Una *tecnica di Criopreservazione* permette di mantenere l’OVOCITA a in LN2 (-196°C) per:

- Arrestare REVERSIBILMENTE IL METABOLISMO
- mantenere L’INTEGRITÀ STRUTTURALE E GENETICA
- raggiungere ACCETTABILI SOPRAVVIVENZE allo scongelamento
- mantenere COMPETENZA DI SVILUPPO
- essere semplice e riproducibile.” (J. Donnez and S. Kim; Edit. Cambridge Med, 2011)



«CONGELAMENTO Lento» o

«metodiche di raffreddamento in equilibrio»

(Whittingham, 1972, Elliott and Whelam, 1977 / Leibo, 1986 / Mazur, 1990)

«CONGELAMENTO Ultrarapido» o

«metodiche di raffreddamento NON in equilibrio»

(Rall and Fahy, 1985 / Trouson, 1986)

Crioconservazione Cellulare

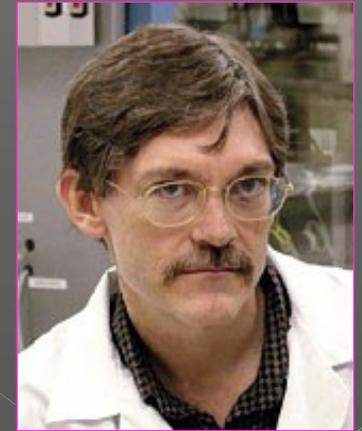
Minimizzare i danni irreparabili agli organelli e membrane

Padre Basile Luyet (1897-1974) → (*BioDynamics* 1937)

«La materia vivente può sopravvivere al congelamento solo se le molecole non sono ordinate, ma solidificate dove sono»

Prof. St Leibo (1937-2014) → (*Cryobiol*, 1978)

«La formazione dei cristalli intracellulari va evitata, per non danneggiare membrane e organelli»



**GLASSY
STATE**

Fahy GM (*Cryobiology*, 1987) →

Qualsiasi materiale può vitrificare, in opportune condizioni di viscosità, veloc di raffreddamento e volume del campione (*Yavine Arav, Th. 2007 / Vajta and Kuwayama, Th. 2006*)

“CONGELAMENTO LENTO versus VITRIFICAZIONE”



- ▣ Moderate [CPAs] (permeanti e non)
 - ▣ Disidratazione Lenta
 - ▣ Velocità di raffreddamento Graduale e Controllata
- Planer

- ◇ Minimizzare la formazione di cristalli di ghiaccio intracellul con formazione di essi nel comparto extracellul (seeding) a -6°C



- ▣ Elevata Viscosità → Alte [CPA] (permeanti e non)
 - ▣ Rapida disidratazione dell'acqua libera nell'ovocita
 - ▣ Alta Velocità di Cooling/Warming
- differenti devices/carriers/supporti

- Stato liquido amorfo solidificato (senza cristallizzazione) di estrema viscosità e velocità di cooling/warming
- ◇ Minimizzare la tossicità dell'elevata [soluti] che inibiscono la nucleazione e crescita dei cristalli di ghiaccio

Vitrificazione

(Ultrarapida o Non in Equilibrio)

**RESA
della
VITRIFICAZIONE =**

(Velocità di raffreddamento/riscaldamento
 \times
Viscosità soluzione)

Volume soluzione

**Elevate
concentrazioni
CPAs**

→ Inibizione
nucleazione
e cristallizzazione

**“Minimum Volume Cooling”
(MVC)**

**Implementazione
Differenti DEVICES:
APERTI O CHIUSI**

**Metodica
Ultrarapida**

→ Minimizzazione
Tossicità
CPAs

Congelamento LENTO

TRE DIFFERENTI PROTOCOLLI per la crioconservazione ovocitaria
succedutisi nel tempo:

☐ Soluzione di congelamento con 1,5M PrOH + 0,1M saccarosio →
scongelamento a 0,2M saccarosio (La Salle, 1985/ Gook, 1995/ Borini, 2004)

- TASSI DI SOPRAVVIVENZA E FERTILIZZAZIONE (di 37% e 45,4%): BASSI rispetto agli ovociti freschi

- Granuli corticali RIDOTTI in densità e numero (Nottola, 2006)

☐ Soluzione di congelamento con 1,5M PrOH + 0,3M saccarosio →
scongelamento a 0,3M saccarosio (Borini, 2007)

- CROLLO NELLE PERCENTUALI DI GRAVIDANZA su transfer effettuati (9%) e DI IMPIANTO (5,2%)

- AMPI VACUOLI e granuli corticali pressochè assenti (Nottola, 2007)

☐ Soluzione di congelamento con 1,5M PrOH + 0,2M saccarosio →
scongelamento a 0,3M saccarosio (Borini, 2007) (Nottola, 2007)

- MOLTO BUONE PERCENTUALI DI SOPRAVVIVENZA E DI CLIVAGGIO (72,3% e 95,2%), così come LE PERCENTUALI DI TRANSFER effettuali (87,6%), di gravidanze per transfer (19%) e di impianto (11,57%)

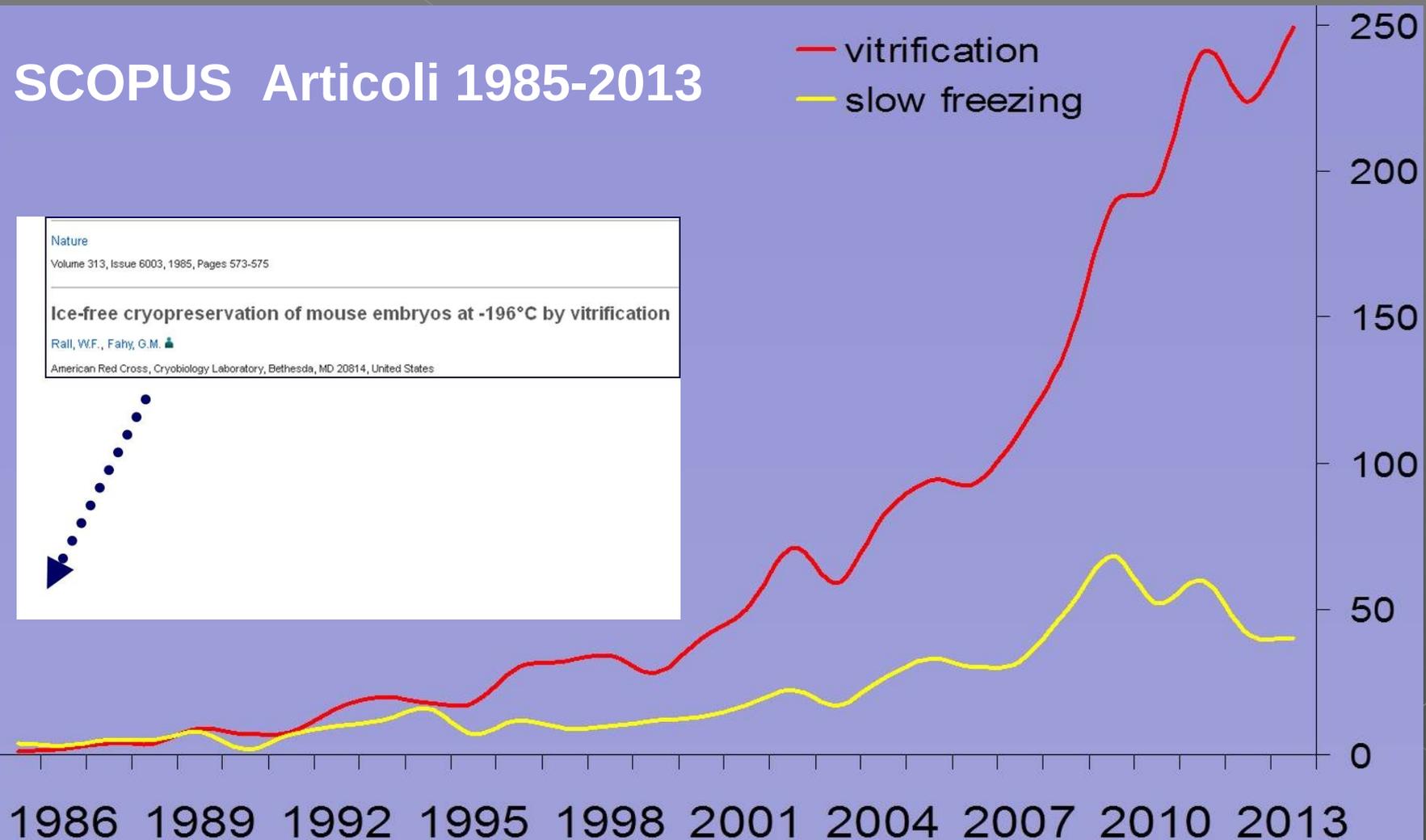
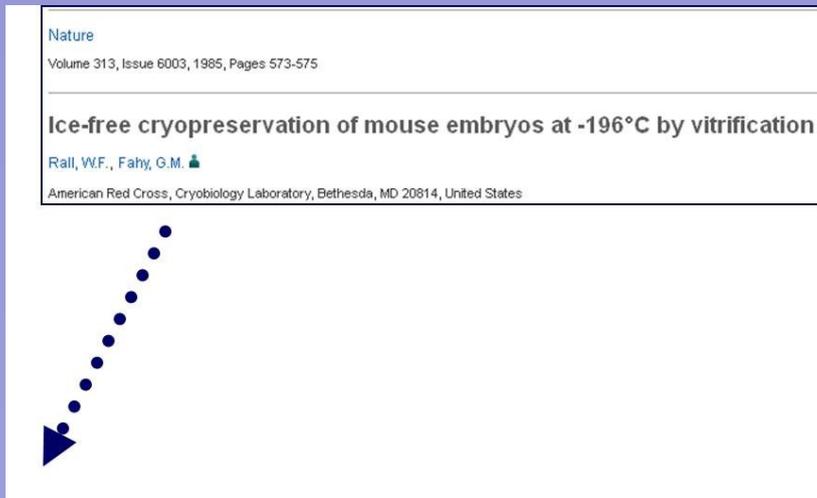
VITRIFICAZIONE

Tecnica d'elezione nei lab PMA (*Parmegiani et al, RBM Online 2014*)

→ «vitrification AND (oocyte OR embryo)»

SCOPUS Articoli 1985-2013

— vitrification
— slow freezing



EFFETTI DELLE PROCEDURE DI VITRIFICAZIONE SULLA CONSERVAZIONE DELL'OVOCITA OVINO E SUINO - REPRONEWS 2010 -

NAITANAS¹., LEONI GG²., BERLINGUER F¹., SUCCU S²., SATTÀ V²., BOGLIOLO L³., BEBBERE D³., LEDDA S

MORFOLOGICI:

- Citomembrane (*Tian et al, 2007*)
- Fuso Meiotico (*Martinez-Burgos et al*)
- Apoptosi (*Men et al, 2003* ↔ *Stack*)
- Riduzione volume ovocita, Au
- Frammentaz DNA (*Men et al, 2003*)

FUNZIONALI:

- Redox Status (*Somfai et al, 2007*)
- Livelli MPF (*Succu et al, 2007*)
- Down-regolaz (*Succu et al, 2008*)
- Attivazione partenogenica spor
- Alterazione istoni (*Yan et al, 201*)
- Contenuto di ATP e competenz

OVOCITA UMANO MATURO :

ALTERAZIONE PROFILO GENICO

ROTTURE AL DNA PRIVO DI SISTEMI DI RIPARAZIONE (RADICALI LIBERI)

(*Chian R-C, JARG 2014*)

METABOLOMICA: LC – MS su E (Day-3) (60 freschi e 60 VT)

Analisi Multivar → la VT non disturba la competenza embrionaria (NO differenze significative

(*Dominguez et al, FS 2013*)

POSSIBILI DANNI ALL'OVOCITA IN SEGUITO AL PROCESSO DI VITRIFICAZIONE - REPRONEWS 2010 – CAPALBO A, ROMANO S, ALBRICCI L, IUSSIG B, UBALDI F E RIENZI L

3 TIPI di DANNO: (*Tucker MJ and Liebermann J, Edit Informa, 2007*)

□ TEMPERATURE RELATIVAMENTE ELEVATE (+15 e -5°C)

→ CHILLING INJURY O DANNO DA RAFFREDDAMENTO

→ *membrana citoplasmatica e microtubuli (fuso) (Ghetler et al, 2005)*

□ TEMPERATURE RELATIVAMENTE BASSE (-5 e -80°C)

→ DANNO DA CONGELAMENTO (cristallizzazione H₂O intracellulare)

□ TEMPERATURE ANCOR PIU' BASSE (-80 e -150°C)

→ citoplasma e zona pellucida (*Rall and Meyer, 1989*)

□ Al di sotto dei -150°C e successivo stoccaggio → il meno pericoloso (*Sansinema, Ther. 2014*)

→ DANNO DA TOSSICITÀ ↑ DANNO DA CONGELAMENTO ↓

APPROCCIO CHE MEGLIO PRESERVA LA FISILOGIA OVOCITARIA (*Gardner et al, Ther. 2007*)

Il successo della Vitrificazione Ovocitaria

- Danni meccanici ridotti
- Minore stress per le cellule (no ghiaccio)
- Più maneggevole nella organizzazione quotidiana
- Protocollo semplice e ripetibile
- Utile per ovociti, embrioni cleavage stage e blastocisti
- Non servono strumenti costosi

CRIOCONSERVAZIONE OVOCITARIA in giovane età (≤ 38 aa) ed.. almeno ≥ 8 MII \pm sovrannumerari

Con la “recursive partitioning analysis” \rightarrow un modello intuitivo generale in grado di prevedere la Prob di ottenere una grav/ paz secondo le sue caratteristiche (N° MII vitrificati, età e giorno dell'ET).

Quando 8 o meno di 8 ovociti sono disponibili, i risultati sono drasticamente ridotti per le donne di età > 38 aa rispetto alle donne più giovani.

Quando + di 8 ovociti sono disponibili, la cultura allo stadio di blastocisti rappresenta la politica più efficace.

Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine
American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama

Ovociti Freschi versus Vitrificati

RISULTATI

Summary of randomized controlled trials comparing fresh versus vitrified oocytes.

	Cobo 2008 (24)	Cobo 2010 (26)	Rienzi 2010 (25)	Parmegiani 2011 (19)
Patient population	Oocyte donors	Oocyte donors	Infertile patients <43 years of age requiring ICSI with >6 mature oocytes	Infertile patients <42 years of age requiring ICSI with >5 mature oocytes
No. patients	30 vitrification 30 fresh	295 vitrification 289 fresh	40 vitrification 40 fresh	31 vitrification 31 fresh
Mean age at retrieval	26	26	35	35
No. oocytes	231 vitrification 219 fresh	3286 vitrification 3185 fresh	124 vitrification 120 fresh	168 vitrification NA fresh
No. oocytes per retrieval	18.2	11	13	NA
Survival	96.9%	92.5%	96.8%	89.9%
Fertilization rate	76.3 vitrification 82.2 fresh	74% vitrification 73% fresh	79.2% vitrification 83.3% fresh	71% vitrification 72.6% fresh
No. transferred vitrification vs. fresh	3.8 vitrification 3.9 fresh	1.7 vitrification 1.7 fresh	2.3 vitrification 2.5 fresh	2.5 vitrification 2.6 fresh
Day of transfer	3	3	2	2-3
Implantation rate	40.8% vitrification 100% fresh	39.9% vitrification 40.9% fresh	20.4% vitrification 21.7% fresh	17.1% vitrification NA fresh
CPR/transfer vitrification vs. fresh	60.8% (23 vitrification transfers) 100% (1 fresh transfer)	55.4% vitrification 55.6% fresh	38.5% vitrification 43.5% fresh	35.5% vitrification 13.3% fresh
CPR/oocyte thawed	6.1%	4.5%	12%	6.5%

Note: All used vitrification with Cryotop, 15% EG + 15% DMSO + 0.5M sucrose. CPR = clinical pregnancy rate.

Practice Committee. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 2013.

Mature oocyte cryopreservation: a guideline

The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology

Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology, Birmingham, Alabama

There is good evidence that fertilization and pregnancy rates are similar to IVF/ICSI with fresh oocytes when vitrified/warmed oocytes are used as part of IVF/ICSI for young women. Although data are limited, no increase in chromosomal abnormalities, birth defects, and developmental deficits has been reported in the offspring born from cryopreserved oocytes when compared to pregnancies from conventional IVF/ICSI and the general population. Evidence indicates that oocyte vitrification and warming should no longer be considered experimental. This document replaces the document last published in 2008 titled, "Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation," Fertil Steril 2008;90:S241-6. (Fertil Steril® 2013;99:37-43. ©2013 by American Society for Reproductive Medicine.)

Earn online CME credit related to this document at www.asrm.org/learn

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertstertforum.com/goldsteinj-mature-oocyte-cryopreservation-guideline/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

RISULTATI

Vitrificazione di ovociti

La situazione è drasticamente cambiata grazie all'evidenza di simili risultati biologici e clinici tra ovociti vitrificati e freschi, tanto da influenzare la posizione delle società scientifiche:

ASRM 2013

'there is good evidence that fertilization and pregnancy rates are similar to IVF/ICSI with fresh oocytes when vitrified/warmed oocytes are used as part of IVF/ICSI in young infertility patients and oocyte donors. No increases in chromosomal abnormalities, birth defects, or developmental deficits have been noted in the children born from cryopreserved oocytes.

This technique should no longer be considered experimental.'

Nati... Follow up...



- *Noyes et al, RBM Online 2009 :*
PUBBLICAZIONI (58) 1986-2008
→ 936 nati da ovociti crioconservati
(635 da lento, 289 da vitrificaz e 12 entrambi) :
1,3% (12) nati con anomalie congenite
- *Wennerholm et al, HR 2009 :*
PUBBLICAZIONI 1984-2008 → 148 da lento e 221 da vitrificazione
- *Chian et al, RBM Online 2008 :* → 200 nati da vitrificazione
- *Pers.comun. Scaravelli G. ISS → Italia : 2000 nati (Chian R-C, JARG 2014)*
- IN LINEA CON I NATI DA CONCEPIMENTO SPONTANEO (0,2-2%
ICBDSR 2011) DA IVF (ANOMALIE CONGENITE E PESO ALLA
NASCITA)
- Necessità di PCT sul FOLLOW UP A LUNGO TERMINE

APPLICAZIONI

“esclusive”

(ASRM, 2007; Gosden et al, 2009; Oktem and Oktay, 2009)

- ▣ Donazione di Ovociti
- ▣ Accumulo in pazienti Low Responders
- ▣ Preservazione della Fertilità
 - Endometriosi o malattie genetiche (POF) (Cobo, Review, FS 2013)
 - Neoplasie (*Alison, Systematic review, JCO 2013*)
 - Patologie non oncologiche (Cobo, Review, FS 2013)

Legge 19 febbraio 2004, n. 40

"Norme in materia di procreazione medicalmente assistita"

3. Qualora il trasferimento nell'utero degli embrioni non risulti possibile per grave e documentata causa di forza maggiore relativa allo stato di salute della donna non prevedibile al momento della fecondazione è consentita la crioconservazione degli embrioni stessi fino alla data del trasferimento, da realizzare non appena possibile.

- ▣ Indicazioni non Mediche / Sociali

(Stoop D, HR 2011 / Garcia-Velasco JA FS 2013)

- Posporre l'esperienza della maternità in assenza di un partner
- Opposizione etica o legale alla crioconservazione embrionaria

human
reproductionORIGINAL ARTICLE *Embryology*

Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial

Ana Cobo*, Marcos Meseguer, José Remohí, and Antonio Pellicer

Studio RCT
Ovociti Freschi versus
Vitrificati

Ovo-donazione

Table III Clinical outcome according to the type of oocytes received

	Egg-bank	Fresh
Number of embryos transferred	267 (90.5)	259 (89.6)
Mean number of embryos replaced	513 (1.74 ± 0.7)	498 (1.72 ± 0.7)
Number of cycles with embryo 're-vitrification' /cryopreservation	196 (66.7)	216 (74.7)*
Mean number of re-vitrified or cryopreserved embryos	592 (2.0 ± 2.1)	743 (2.5 ± 2.3)*
Implantation rate	205 (39.9)	204 (40.9)
Positive hCG test/cycle	165 (55.9)	159 (55.0)
Clinical pregnancy rate/cycle	148 (50.2)	144 (49.8)
Positive hCG test/transfer	165 (61.8)	159 (61.4)
Clinical pregnancy rate/transfer	148 (55.4)	144 (55.6)
Twin pregnancy rate	48 (32.4)	54 (37.5)

How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes

M. Solé^{1,2,*}, J. Santaló², M. Boada¹, E. Clua¹, I. Rodríguez³, F. Martínez¹, B. Coroleu¹, P.N. Barri¹, and A. Veiga^{1,4}

Studio
Ovociti
Freschi versus Vitrificati

RCT
Sibling

Table III Clinical outcomes of cycles performed with fresh and vitrified sibling donor oocytes.

	Fresh oocytes (n = 99)	Vitrified oocytes (n = 99)
Transferred embryos (mean ± SD)	1.82 ± 0.44	1.90 ± 0.34
Clinical pregnancy rate/ transfer (%)	47 (47.5)	53 (53.5)
Implantation rate (%)	33.3	34.0
Ongoing pregnancy rate/ transfer (%)	39 (39.4)	44 (44.4)
Miscarriage rate (%)	9 (19.1)	11 (20.8)
Live birth rate/transfer (%)	38 (38.4)	42 (43.4)
Multiple pregnancy rate (%)	27.7	20.8

Ovo-donazione

OVO-DONAZIONE

- ▮ Con la crioconservazione è possibile garantire gli stessi risultati dei cicli a fresco
- ▮ Non più necessaria sincronizzazione (e lista di attesa)
- ▮ Lo screening sierologico può essere completo (finestra 6 mesi)

Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients

A Cobo ^{a,*}, Nicolás Garrido ^b, Juana Crespo ^c, Remohí José ^c, Antonio Pellicer ^c

A total of 724 LR patients, defined as women in whom ≤ 5 oocytes were retrieved in a single ovarian stimulation (Surrey and Schoolcraft, 2000), were prospectively included in the study. Eligible patients were selected after evaluating their ovarian function. All patients who met the criteria of having a FSH concentration >11 IU/ml on cycle day 3 (Jayaprakasan et al., 2007; Soldevila et al., 2007) and an antral follicle (2–10 mm during early follicular phase) count <6 among both ovaries (Bancsi et al., 2003; Broekmans et al., 2006) were considered eligible for the study. Additionally, anti-Müllerian hormone blood concentrations <5 pmol/l were also considered as an inclusion criteria (Nelson et al., 2009).

I RISULTATI DIMOSTRANO CHE L'ACCUMULO DI OVOCITI VITRIFICATI IN PAZ A BASSA RISPOSTA È ASSOCIATA AD:

- o TASSO PIÙ BASSO DROP-OUT
- o RIDUZ CANCELLAZIONI TRASFER
- o MAGGIOR LBR/PAZ
- o PIÙ CICLI CON E-VITRIF
- o MAGGIOR LBR CUMULATIVO →
- ALTERNATIVA DI SUCCESSO per le PAZ Low R.**

Table 5 Clinical outcomes after additional cryotransfers.

	LR-Accu-Vit	LR-fresh
No. of surplus embryo vitrification cycles	70	51
Vitrification rate/patient		
n/total	70/242	51/588
% (95% CI)	28.9 (23.2–34.6) ^a	8.7 (6.4–11.0) ^a
Warming cycles	52	45
Transfers		
n/total	48	34
% (95% CI)	92.3 (85.1–99.6)	75.6 (62.9–88.1)
Implantation rate		
n/total	21/73	7/34
% (95% CI)	28.8 (19.1–35.5)	20.6 (9.0–34.2)
Embryos transferred (mean, 95% CI)	1.5 (0.5–2.5)	1.0 (0.1–2)
Clinical pregnancies/warming cycle initiated		
n/total	20/52	10/45
% (95% CI)	38.5 (25.3–51.7)	22.2 (10.1–34.3)
Live births/warming cycle initiated		
n/total	15/52	6/45
% (95% CI)	28.8 (16.5–51.1)	13.3 (3.4–23.2)
Live births/cryotransfer		
n/total	15/48	6/34
% (95% CI)	31.3 (18.2–44.4)	17.6 (4.8–30.4)

Values are n or % (95% CI), unless otherwise stated.

Same superscript letters in a row indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

LR-Accu-Vit = low response, accumulation of oocytes and vitrification; LR-fresh = low response, fresh oocytes.

Accumulo di Ovociti

	LR-Accu-Vit n=242	LR-fresh n=482
Low resp ≤ 5 ovo		
Embryo transfers (n)	220	318
Transfer cancellations/patient (%; 95% CI)	9.1 (6.8–11.4) ^a	34.0 (29.8–38.2) ^a
Implantation rate		
n/total	110/440	138/540
% (95% CI)	25.0 (20.7–30.0)	25.6 (21.9–29.3)
Embryos transferred (mean; 95% CI)	2.0 (1.9–2.1) ^b	1.7 (1.6–1.8) ^b
Live-birth rate/embryo transfer		
n/total	73/220	108/318
% (95% CI)	33.2 (25.7–38.0)	34.0 (28.7–39.1)
Live-birth rate/patient		
n/total	73/242	108/482
% (95% CI)	30.2 (24.3–35.9)	22.4 (18.7–26.1)
Cumulative live-birth rate/patient ^c		
n/total	88/242	114/482
% (95% CI)	36.4 (30.3–42.4) ^d	23.7 (19.9–27.4) ^d

Table 1 Ovarian stimulation cycles and drop outs in the LR-fresh group.

	<i>Ovarian stimulation cycle</i>					
	1	2	3	4	5	6
Patients (n)	397	70	12	2	0	1
Ovarian stimulation cycles (n)	397	140	36	8	0	6
Live births						
n/total	93/397	13/70	3/12	0	0	0
% (95% CI)	23.4 (19.2–27.6)	18.6 (9.4–27.6)	25.0 (0.5–49.5)			
Patients eligible for further treatment (n) ^a	304	57	9	2	2	1
Drop outs ^b						
n/total		234/304	45/57	7/9		–
% (95% CI)		77.0 (72.3–81.7)	78.9 (68.3–89.5)	77.8 (50.6–100)		100 %

ACCUMULO DI OVOCITI nelle pazienti Low Responders

Protocollo terapeutico per le low responders →

- › Diminuisce il tasso di drop out
- › Diminuisce il tasso di cicli con mancato ET
- › Aumenta l'efficacia della procedura

Fertility Preservation

- ESHRE Ethics and Law Task Force:
 - › 2004 ‘*oocyte freezing for fertility preservation without a medical indication should not be encouraged*’
 - › 2012 ‘*In the light of new scientific developments, ... oocyte cryopreservation to improve prospects of future child bearing should also be available for non-medical reasons*’.

Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications

Juan A. Garcia-Velasco, M.D.,^{a,d} Javier Domingo, M.D.,^b Ana Cobo, Ph.D.,^c Maria Martínez, M.D.,^a Luis Carmona, M.D.,^b and Antonio Pellicer, M.D.^c

^aIVI-Madrid, Madrid; ^bIVI-Las Palmas, Las Palmas; ^cIVI-Valencia, Valencia; and ^dRey Juan Carlos University, Madrid, Spain

Objective: To evaluate the results of controlled ovarian hyperstimulation (COH) for oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications.

Design: A retrospective, multicenter, observational study performed between March 2007 and June 2012.

Setting: University-affiliated infertility clinics.

Patient(s): Of 560 nononcological patients and 475 oncological patients, we performed 1,080 oocyte vitrification cycles, 725 for nonmedical reasons and 355 in patients affected with cancer. Cycle outcome is presented, including 30 women who returned to use their frozen eggs with, 20 pregnancies obtained, 6 newborns, and 8 ongoing pregnancies.

Intervention(s): Controlled ovarian hyperstimulation, oocyte retrieval, warming of oocytes, and ET in those who already came back.

Main Outcome Measure(s): Days of stimulation, total dose of gonadotropins, estrogen (E) and P levels, number of oocytes retrieved and vitrified, pregnancy rate (PR).

Result(s): Comparable results were obtained in both groups of patients, with lower total dose of gonadotropins used and lower serum E₂ levels in patients affected with cancer. Frozen/thawed oocytes performed similarly in both groups.

Conclusion(s): Patients who vitrify eggs for medical or nonmedical reasons perform similarly, as observed in this large series. This technique offers realistic expectations to both groups of patients to have a child with their own eggs. These data could be used to adequately counsel our patients. (Fertil Steril®

2013;99:1994–9. ©2013 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Fertility preservation, oocyte vitrification, cancer, social freezing, newborns



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for

Multicentrica → PAZIENTI CHE VITRIFICANO OVOCITI PER MOTIVI MEDICI O NON MEDICI rendono ALLO STESSO MODO.

QUESTA TECNICA OFFRE ASPETTATIVE REALISTICHE PER ENTRAMBI I GRUPPI DI PAZIENTI.

Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients?

Ana Cobo, Ph.D.,^a Juan A. Garcia-Velasco, M.D.,^b Javier Domingo, M.D.,^c José Remohí, M.D.,^a and Antonio Pellicer, M.D.^a

^a IVI Valencia, Valencia; ^b IVI Madrid, Madrid; and ^c IVI Las Palmas, Las Palmas, Spain

TABLE 1

Clinical outcomes and live births reported in cancer patients who preserved fertility through oocyte cryopreservation (slow freezing and vitrification).

	Yang et al., 2007 (158)	Porcu et al., 2008 (159)	Sánchez Serrano et al., 2009 (160)	Kim et al., 2011 (161)	García-Velasco, 2013 (120)
Type of malignancy	Hodgkin lymphoma	Borderline ovarian tumor	Breast cancer	Chronic myeloid leukemia	Non-Hodgkin lymphoma
Cryopreservation technique	Slow freezing	Slow freezing	Combined OTC-SF + OV (Cryotop)	Vitrification (EMG)	Vitrification (Cryotop)
Age at FP, y	27	26	36	22	31
No. of cryopreserved oocytes	13	7	16	7	4
Storage time (y)	6	4	2	9	2
Twin or single pregnancy	Single ^a	Twin	Twin	Single	Single
No. of live births	1	2	2	1	1
Weeks of gestation	37	38	34	35 + 3 d	39
Weight of baby, g	3,062	2,100 and 2,400	1,650 and 1,830	2,410	3,440
Sex of baby	Male	Females	Males	Male	Male

Note: EMG = electron microscope grids; FP = fertility preservation; OTC-SF = ovarian tissue cryopreservation; OV = oocyte vitrification.

^a Gestational carrier.

Cobo. Oocyte vitrification for fertility preservation. *Fertil Steril* 2013.

Although the current evidence on the outcome of oocyte vitrification for FP is very limited, experience available in infertile patients may be useful for counseling purposes.

FP should be tailored specifically to each patient to achieve optimal results. Special care must be paid to any condition and to the decision on the number of oocytes to be stored. Patients must be counseled objectively according to their possibilities and current evidence to avoid false hopes. Interdisciplinary collaboration is required, especially in cancer patients, with oncologists etc.

The collection of clinical outcome data from IVF cycles conducted with vitrified oocytes stored by women affected or not by cancer disease is emerging. A long-term follow-up of babies born is mandatory to definitively consolidate the strategy. Finally, women have become mothers to date thanks to FP through oocyte vitrification, enabling us to start thinking about the future now.

Review → LA VITRIFICAZIONE OVOCITARIA come PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ nell'ambito oncologico ad oggi ha dato ancora risultati LIMITATI.

Quali CRITICITÀ..

EFFICACIA UNIVOCA DELLA METODICA

- OPERATORE «Learning curve»-Dipendente

(De Santis L., Placenta 2011)

- Metodica Dipendente: Terreni / Protocollo / Supporti

(Kuwayama M, RBM Online 2005 / Paffoni A, RBM Online 2011)

- Non definiti ad oggi dei SOLIDI PARAMETRI PREDITTIVI POSITIVI

sugli ovociti (dal giorno del opu) in termini di “resa” allo scongelamento

→ esistenti invece per la EC (Fertilization rate, Grading, Blastulazione)

BIOSICUREZZA DELLA METODICA

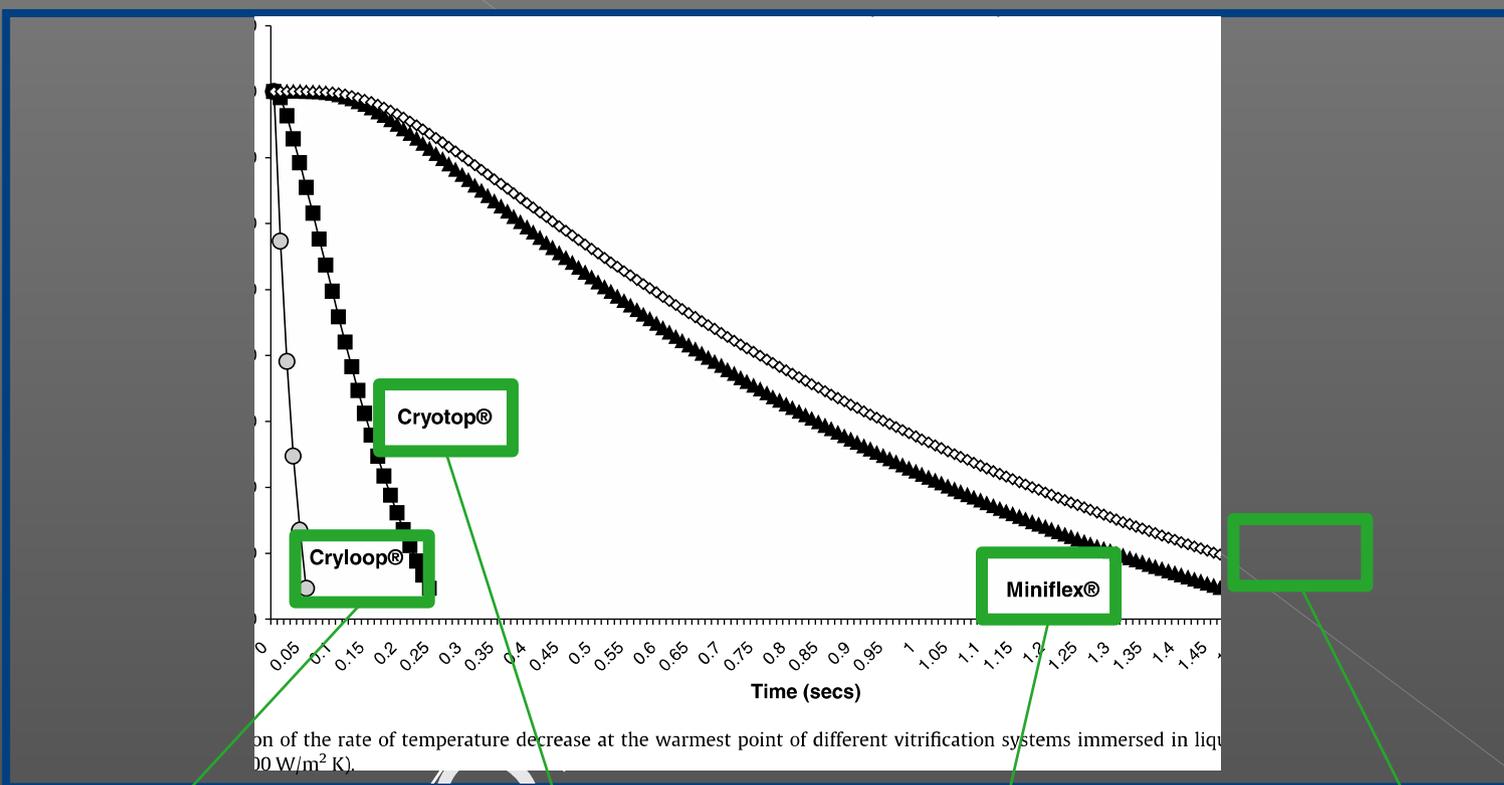
- Potenziale rischio di contaminazione da azoto in vitrificazione e/o cross-contaminazione in fase di stoccaggio tra campioni

- Esigenze dettate dalla Normativa Vigente → CONVALIDA e AZOTO DM(?)



COMPARAZIONE TRA SISTEMI APERTI

Simulazione numerica dei cooling rates di diversi devices **APERTI: I Surface carrier sono più efficienti sistemi per trasferire calore** (Sansinena M, Cryobiology 2011)



180,000°C°/min

37,500°C°/min

6164°C°/min

5521°C°/min

Cooling rates (°C/min) = time needed to reduce initial temperature at the warmest point of the system from 20 to -130 °C for the different vitrification devices

Evidenze di carattere (pre-) clinico

CRITICITÀ

been no randomized, controlled experimental
different devices

- Confronto Open "Surface" vs Closed "Tubing" carrier (Kuwayama M, *Reprod Biomed Online* 2005) →

- (Paffoni A, *Reprod Biomed Online* 2011) →

Open "Surface" carrier →
Closed "Surface" carrier →
Closed "Tubing" carrier →

361 Uncited reference
362 Q2 [77].

363 References

364 [1] R.C. Chian, P. Quinn, in: R.C. Chian, P. Quinn (Eds.), *Fertility Cryopreservation*, Cambridge University Press, pp. 134.

365 [2] N. Cremades, M. Sousa, J. Silva, P. Viana, S. Sousa, C. Olivera, J. Teixeira da Silva, A. Barros, Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using small diameter plastic micropipettes. *Hum Reprod* 19 (2004) 300–305.

366 [3] X. He, E.Y.H. Park, A. Fowler, L.M. Yarmush, M. Toner, Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz microcapillary: a study using murine embryonic stem cells. *Cryobiology* 56 (2008) 223–232.

367 [4] J.K. Jain, R.P. Paulson, Oocyte cryopreservation. *Fert. Ster.* 86 (2006) 1037–1046.

368 [5] M. Kida, Y. Kikuchi, O. Takahashi, I. Michiyoshi, Pool-boiling heat transfer in liquid nitrogen. *J. Nucl. Sci. Tech.* 18 (1981) 501–513.

369 [6] M. Kuwayama, Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *The Jpn Embryo* 67 (2007) 73–80.

370 [7] M. Kuwayama, P. Holm, H. Jacobsen, T. Greve, H. Callesen, Successful cryopreservation of human embryos by vitrification. *Zygote* 14 (1997) 308–311.

371 [8] M. Kuwayama, G. Vajta, O. Kato, S.P. Leibo, Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 11 (2005) 300–308.

372 No significant differences between corresponding values were found.

Table 1 Vitrification of cleavage and blastocyst stage embryos using open and closed carriers

Cleavage Stage Vitrification						
Carrier	Total embryos (n)	Recovery (%)	Survival (%)	Blastocyst formation after 48 hour culture (%)	Total blastomeres (mean ± SD)	% DNA Damage (mean ± SD)
Cryoloop	60	100	100	95	81.9 ± 14.0	1.85 ± 2.05
HSV	52	100	100	94	82.5 ± 15.6	2.06 ± 1.50
Cryotip	67	85*	100	98	78.6 ± 17.9	2.12 ± 2.04

Blastocyst Stage Vitrification						
Carrier	Total embryos (n)	Recovery (%)	Survival (%)	Re-expansion (%)	Total blastomeres (mean ± SD)	% DNA Damage ** (mean ± SD)
Cryoloop	44	100	100	100	86.4 ± 25.8	4.36 ± 2.72
HSV	55	100	100	100	85.9 ± 23.7	3.34 ± 2.79
Cryotip	52	75 *	79	79	88.0 ± 19.2	3.41 ± 2.66

The clinical pregnancy rates per patient (8.3% with CryoTip and 28.6% with CryoTop) achieved using either cryopreservation method appear to be quite low. However, it is

clusion, fertilization, cleavage and good-quality embryo rates are similar using fresh or CryoTop vitrified oocytes subjected to ICSI. The CryoTip method, on the contrary, results in reduced developmental rates. Direct comparison

Dati Clinici

		n°	S.R.	P.R./Thawing
▣ Kuwuyama 2005	Oocytes	64	91	41.3
▣ Lucena 2006	Oocytes	159	97	56,5
▣ Antinori 2007	Oocytes	330	91	32.5
▣ Cobo 2008	Oocytes	243	97	65.2
▣ Cobo 2008	Oocytes	797	96	63.2
▣ Ubaldi 2010	Oocytes	487	89,7	30,4
▣ Cobo, 2010	Oocytes	3039	92,5	50,2
▣ Trokoudes 2011	Oocytes	210	91	55
▣ Rienzi, 2012	Oocytes	2721	2304	37,5

Referenze Scientifiche

Bonetti A, Fertil Steril, 2011
Cobo A., Human Reproduction, 2010.
Rienzi L., Human Reproduction 2009.
Nagy, P., Fertility & Sterility 2009.
Cobo A., Clin Trans Oncolo 2008.
Chang C., Reproductive BioMedicine Online 2008.
Cobo A., Kuwayama M., Fertility & Sterility 2008.
Antinori M. Reproductive BioMedicine Online, 2007.
Kuwayama M., Theriogenology 2007.
Lucena E., Fertility & Sterility 2006.
Vajta G., Kuwayama M., Theriogenology 2006.
Kuwayama M., Reproductive BioMedic Online 2005.
Kyono K., Fertility & Sterility 2005.
Katayama K.P., Fertility & Sterility 2003.

Sistemi CHIUSI

Grazie all'affinamento di:

- **Tecnica: “Slush LN2”** (Yoon, *Fertil Steril* 2007)
- **materiali (sempre più sottili)**
- **minimizzazione dei volumi di caricamento (da 1ml a 0,2 ml)**
- **Potenziale Miglioramento dei risultati**

EFFICACIA OK
Sistema →



Quanto è probabile
il rischio infettivologico?



..Procedura eseguita attraverso il torrente circolatorio vs vagina e utero

- Incidence reporting per complicanze infettivologiche → estremamente rari
(pick up nella barriera mucosa o patol tubariche) (Kastrop PMI, HR 2007)
- Rischio dell'operatore → poco reale
(trasmiss non aerea HBV, HCV, HIV eccezione Clamidia) → cappa a flusso verticale
- Pazienti obbligatoriamente screenate per le principali patologie virali infettivologiche → patologia ignota?
- A seguito delle procedure: minimizzazione rischio → (Pomeroy KO, Fertil Steril 2010)
- Possibili contaminazioni: solo in condizioni sperimentali:

(Bielansky, Criobiol 2000-2003 / Theriogenology 2005-2007-2012)

(Criado, Fertil Steril 2011)

(Fountain, Trasfusion 1997)

Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes

CRITICITÀ

L Parmegiani ^{a,*}, GE Cognigni ^a, S Bernardi ^a, S Cuomo ^b, W Ciampaglia ^a,
FE Infante ^a, C Tabarelli de Fatis ^a, A Arnone ^a, AM Maccarini ^a, M Filicori ^a

Reproductive BioMedicine Online (2011) 23, 505–512

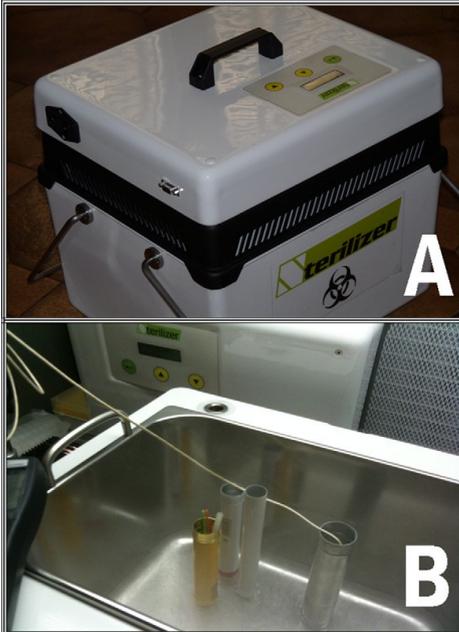


Figure 5 Ultraviolet sterilization and hermetical cryostorage. Prototype of a specifically designed device for UV LN₂ (liquid nitrogen) sterilization (Nterilizer; A). Cryotops are enclosed in home-made hermetical aluminium cylindrical containers (high-security goblets; B). The goblets are submerged vertically in LN₂ in order to avoid the infiltration of LN₂ and checked for an inner temperature of -196°C at the end of the UV sterilization process.

→ Studio Prospettico Randomizzato

L'uso dello sterilizzatore UV e lo stoccaggio chiuso non influenzano la competenza di sviluppo degli ovociti vitrificati

Aseptic open vitrification and hermetical cryostorage

507

Table 1 Laboratory results: fresh versus sibling vitrified–warmed oocytes.

Variable	Fresh oocytes	Vitrified–warmed oocytes
No. of injected oocytes	3.9 ± 0.2	4.1 ± 0.2
Fertilization rate	106/120 (88.3)	107/126 (84.9)
Cleavage rate	77/106 (72.6)	76/107 (71.0)
Grade-1 embryo rate	26/77 (33.8)	20/76 (26.3)
No. of transferred embryos	2.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1

Values are mean ± standard error or *n*/total (%).

No statistically significant differences were found between the two groups.

Figure 2 Absence of contamination with straw-in-straw closed carrier. This vitrification system avoids the direct contact between cells and LN₂ (liquid nitrogen) and also any risk of contamination. Frozen micro-organisms in LN₂ adhere to the external straw, which is hermetically sealed. At warming the inner straw is extracted from the external straw and immersed in the culture medium with no risk of contamination.

Sterilizzatore UV di azoto
liquido

(Parmegiani, L., Hum
Reprod, 2009)

+

Sistema “surface” aperto
con contatto
diretto con azoto
(vitrificazione)

+ stoccaggio in goblets
chiusi senza azoto
all'interno

Efficiente decontaminante di devices in condizioni sperimentali
estreme (Parmegiani, FS 2012)

Hermetical goblets for cryostorage of human vitrified specimens

Lodovico Parmegiani^{1*} and Laura Rienzi²

Hum. Reprod. Advance Access published September 9, 2011

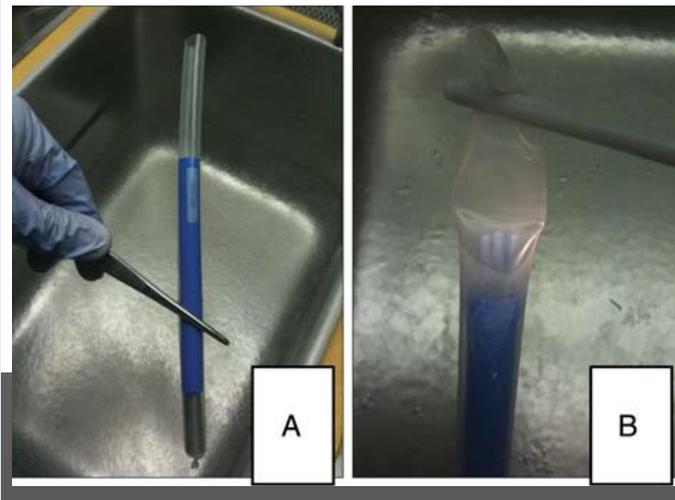
Sterilizzatore UV di azoto
liquido

(Parmegiani, L., *Hum
Reprod*, 2009)

+

Sistema "surface" aperto
con contatto
diretto con azoto
(vitrificazione)

+ stoccaggio in goblets
chiusi senza azoto
all'interno



Cryoflex +
stainless steel weight +
visotube

- (i) heat seal one end of the Cryoflex with a heat gun, according to manufacturer's instructions for use (<http://www.nuncbrand.com>);
- (ii) cut the Cryoflex to obtain a pipe of ~25 cm in length;
- (iii) disinfect the outer and the inner (with a cotton swab) surface of Cryoflex by wiping with ethanol for at least 5 min (Sopwith *et al.*, 2002);
- (iv) put a sterilized stainless steel weight inside the Cryoflex in order to prevent it floating during cryostorage;
- (v) put a sterilized coloured visotube (labelled with patient/specimen's code) inside the Cryoflex (Fig. 1A)
- (vi) pre-cool for at least 10 min (Parmegiani *et al.*, 2011) the Cryoflex by submerging it in sterilized LN₂, taking care to keep it vertical in order to prevent the infiltration of LN₂;
- (vii) after vitrifying the cells/tissue in sterilized LN₂, insert the carriers in the visotube, taking care to keep the strip/palette/hook/hemistraw/single-straw/etc. containing the cells/tissue in the nitrogen vapour phase above the LN₂ (Parmegiani *et al.*, 2011);
- (viii) heat seal the remaining open end of the Cryoflex and store this hermetical goblet containing the carriers in a LN₂ cryobank, avoiding any potentially dangerous temperature shock (McDonald *et al.*, 2011); the goblet should always be kept below -180°C degrees, which seems to be the safest threshold for vitrified human oocytes (Cobo *et al.*, 2010).

Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen

Ana Cobo, Ph.D., Josep Ll. Romero, Ph.D., Sonia Pérez, Ph.D., María J. de los Santos, Ph.D., Marcos Meseguer, Ph.D., and José Remohí, M.D.

TABLE 2

Oocyte distribution, survival, and clinical outcome.

	Vapor-phase nitrogen	LN	P value
No. vitrified oocytes (mean ± SD)	464 (10.5 ± 3.1)	473 (10.0 ± 2.1)	.401
Survival no. (%)	442 (95.3)	447 (94.5)	.354
No. injected oocytes	442	447	
Normal fertilization no. (%)	323 (73.1)	320 (71.7)	.645
Abnormal fertilization no. (%)	24 (5.4)	23 (5.1)	.847
Degenerated oocytes no. (%)	25 (5.7)	27 (6.0)	.735
No. transfers	43	45	
No. embryos transferred (mean ± SD)	87 (1.9 ± 0.3)	88 (1.8 ± 0.5)	.300
Pregnancy rate/transfer	26 (60.4)	27 (60.0)	.964
Clinical pregnancy rate/transfer	25 (58.1)	24 (53.3)	.649
Clinical pregnancy rate/cycle	25 (56.8)	24 (52.2)	.657
Miscarriage rate	4 (16.0)	3 (12.5)	.727
Implantation rate = No. sacs/No. embryos transferred	35 (40.2)	30 (34.1)	.400
Multiple pregnancy rate (twin)	9 (36.0)	7 (29.1)	.490
Ongoing pregnancy rate/transfer	21 (48.8)	21 (46.6)	.902
Ongoing pregnancy rate/cycle	21 (47.7)	21 (45.6)	.902
Live births	7	5	

Note: Unless otherwise indicated, numbers in parentheses are percentages.

Cobo. Vapor storage for vitrified oocytes. Fertil Steril 2010.

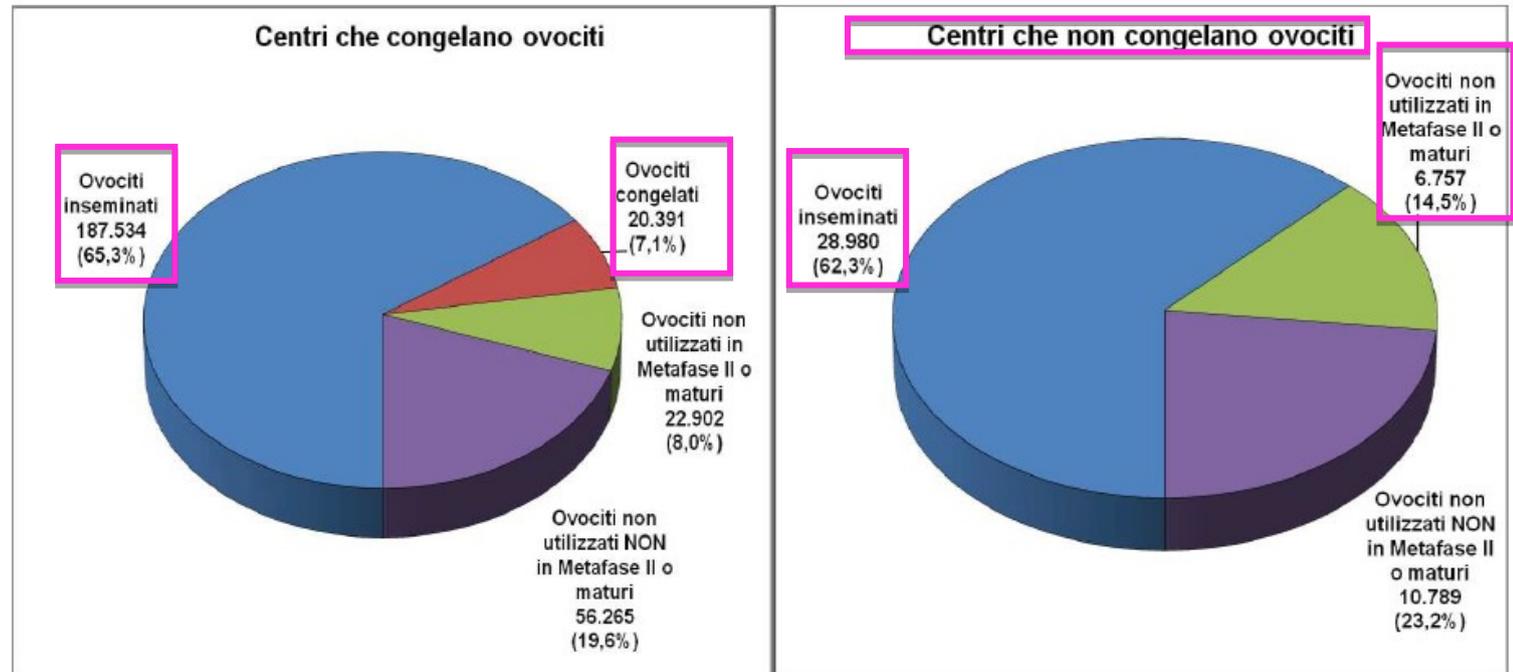
Azoto Liquido
Filtrato
(vitrificazione)
+
sistema "surface"
aperto
con contatto
diretto con azoto
+ stoccaggio in
vapori d'azoto

Studio Prospettico Randomizzato

Evitata la cross-contaminazione e Mantenuto lo stesso potenziale di sviluppo (C.R. e BL f. %)



Figura 3.38: Percentuale e numero di ovociti inseminati, congelati e non utilizzati sul totale degli ovociti prelevati, nell'anno 2011 in centri che effettuano congelamento di ovociti e in centri che non effettuano congelamento di ovociti.



Tab. 3.47 Distribuzione dei prelievi, dei cicli in cui si è effettuato congelamento di ovociti, dei cicli in cui si è effettuato congelamento di embrioni e delle rispettive percentuali sul totale di prelievi effettuati nell'anno 2011, secondo la dimensione dei centri.

Dimensione dei Centri	Prelievi effettuati	Cicli con congelamento di ovociti	% di cicli in cui si è effettuato il congelamento di ovociti sul totale dei prelievi effettuati	Cicli con congelamento di embrioni	% di cicli in cui si è effettuato il congelamento di embrioni sul totale dei prelievi effettuati
<100 Cicli	1.977	88	4,5	186	9,4
100-199 Cicli	4.177	219	5,2	324	7,8
200-499 Cicli	15.502	816	5,3	1333	8,6
500-1000 Cicli	12.183	453	3,7	1257	10,3
1001-1500 Cicli	8.352	809	9,7	1629	19,5
1501-2000 Cicli	6.356	636	10,0	1754	27,6
>2000 Cicli	1.739	195	11,2	382	22,0
Totale	50.286	3.216	6,4	6.865	13,7

Ancora ad oggi:
L'INCIDENZA dei
CONGEL OVOCITARIO
nei centri italiani
sono fatti in base alla
disponib personale del lab
(dimens Centri)

Roma, 19 luglio 2013

RELAZIONE DEL MINISTRO DELLA SALUTE AL PARLAMENTO SULLO STATO DI ATTUAZIONE DELLA LEGGE CONTENENTE NORME IN MATERIA DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA (LEGGE 19 FEBBRAIO 2004, N. 40, ARTICOLO 15)

- Attività anno 2011 centri procreazione medicalmente assistita
- Utilizzo dei finanziamenti (artt. 2 e 18) anno 2012

Figura 3.9: Distribuzione dei centri secondo la percentuale di cicli da tecniche a fresco (FIVET e ICSI) in cui si è effettuato congelamento di ovociti rispetto ai prelievi effettuati, nell'anno 2011. Totale 179 centri.

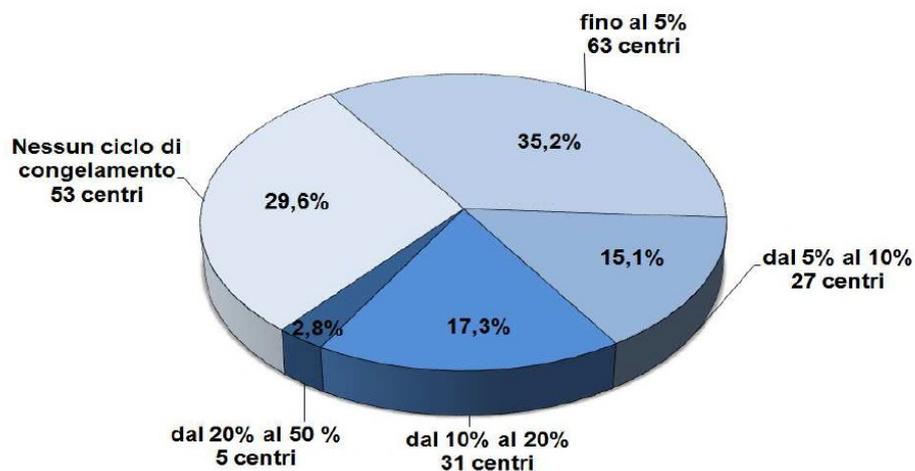


Figura 3.14: Percentuali di gravidanze ottenute sui trasferimenti eseguiti da tecniche di scongelamento e da tecniche a fresco (FIVET e ICSI) nell'anno 2011.

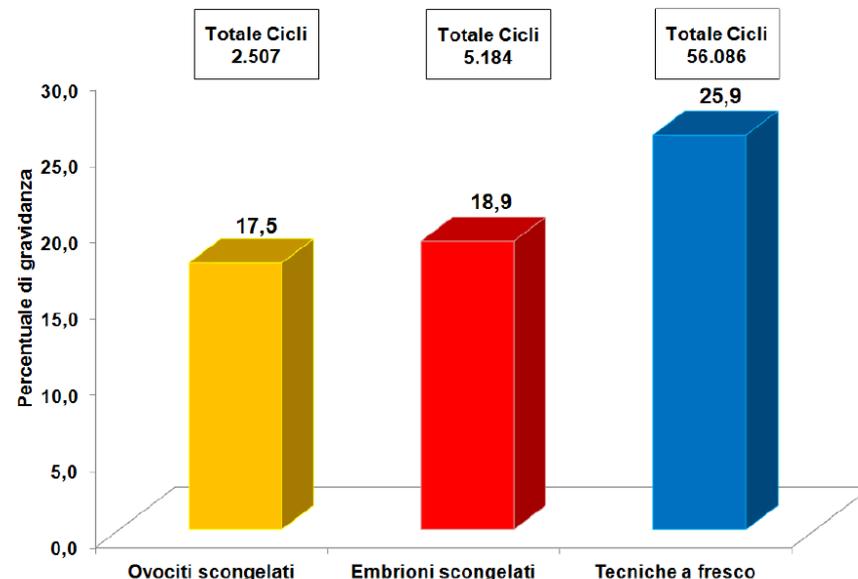
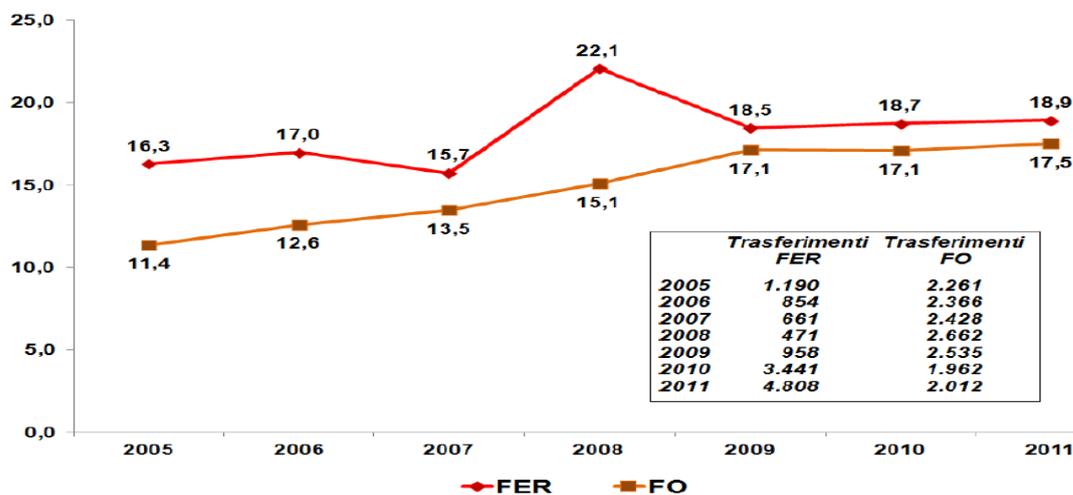


Figura 3.28: Percentuali di gravidanza ottenute con tecniche di scongelamento (FER-FO) sui trasferimenti eseguiti. Anni 2005-2011.



	Trasferimenti FER	Trasferimenti FO
2005	1.190	2.261
2006	854	2.366
2007	661	2.428
2008	471	2.662
2009	958	2.535
2010	3.441	1.962
2011	4.808	2.012

LE GRAV CLINICHE da CONG EMBRIONI ed OVOCITÌ nei centri italiani sono COMPARABILI .

Roma, 28 giugno 2012

LE GRAV CLINICHE da CONG OVOCITÌ nei centri italiani sono COMPARABILI utilizzando le 2 tecniche

Classi di Età	Cicli Iniziati		Gravidanze		% di Gravidanze	
	FER	FO	FER	FO	FER	FO
≤34	1.487	962	295	136	19,8	14,1
35-39	1.635	1.055	294	150	18,0	14,2
40-42	527	318	54	43	10,2	13,5
≥43	109	106	2	6	1,8	5,7
Totale	3.758	2.441	645	335	17,2	13,7

LE GRAV CLINICHE da CONG EMBRIONI ed OVOCITÌ nei centri italiani sono RIDOTTE rispetto ai dati di letteratura e SORPRENDENTEM CALANO CON L'ETÀ PIÙ DRASTICAM da scong embrionario.

Human oocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry data, 2007–2011

- ▣ Studio Retrospettivo
- ▣ Eterogeneità di clinici e protocolli
- + Popolazione infertile (non selez)
- + Anche centri con min esper in VT

Conclusion(s): VT showed a statistically significant higher performance than SF. As with other ART procedures, the results are not homogeneous among clinics and protocols, but they confirm the clinical value of oocyte cryopreservation in infertile patients. (Fertil Steril® 2014; ■: ■–■. ©2014 by American Society for Reproductive Medicine.)

Paolo Emanuele Levi Setti, M.D.,^a Eleonora Porcu, M.D.,^b Pasquale Patrizio, M.D, M.B.E.,^c Vincenzo Vigiliano, B.Sc.,^d Roberto de Luca, B.Sc.,^d Paola d’Aloja, Ph.D.,^d Roberta Spoletini, B.Sc.,^d and Giulia Scaravelli, M.D., Ph.D.^d

TABLE 2

Total embryos per thawed/warmed oocytes and per injected oocytes following slow freezing and vitrification cycles.

Year	Total embryos per thawed/warmed oocytes						Total embryos/injected oocytes					
	SF	%	VT	%	OR (95% CI), SF (SF = 1) vs. VT		SF	%	VT	%	OR (95% CI), SF (SF = 1) vs. VT	
					P value	P value					P value	
2007	4,173/12,573	33.2	1,049/2,317	45.3	1.67 (1.52–1.82)		4,173/6,008	69.5	1,049/1,370	76.6	1.44 (1.25–1.65)	
2008	4,536/13,592	33.4	1,155/2,949	39.2	1.29 (1.18–1.40)		4,536/6,445	70.4	1,155/1,683	68.6	0.92 (0.82–1.03)	
2009	3,868/10,821	35.7	2,507/5,707	43.9	1.41 (1.32–1.50)		3,868/5,523	70.0	2,507/3,488	71.9	1.09 (1.00–1.20)	
2010	2,393/6,068	39.4	2,951/6,906	42.7	1.15 (1.07–1.23)		2,393/3,633	65.9	2,951/4,430	66.6	1.03 (0.94–1.13)	
2011	1,947/4,868	39.8	3,695/8,625	42.8	1.16 (1.08–1.25)		1,947/2,873	67.8	3,695/5,742	64.4	0.92 (0.84–1.01)	
Overall	16,874/47,914	35.2	11,357/26,504	42.9	1.38 (1.34–1.42)		16,874/24,482	68.9	11,357/16,713	68.0	0.96 (0.92–1.00)	

TABLE 3

Implantation rates following slow freezing, vitrification, and fresh cycles.

Year	SF		VT		Fresh		OR (95% CI), SF (SF = 1) vs. VT		P value, SF vs. VT	P value
	SF	%	VT	%	Fresh	%	OR (95% CI), SF (SF = 1) vs. VT			
2007	309/4,173	7.4	81/1,049	7.7	9,868/70,382	14.0	1.05 (0.81–1.35)		.727	<.001
2008	369/4,536	8.1	100/1,155	8.7	11,219/78,407	14.3	1.07 (0.85–1.35)		.564	<.001
2009	286/3,463	8.3	230/2,137	10.8	12,452/86,306	14.4	1.34 (1.12–1.61)		.002	<.001
2010	164/1,966	8.3	208/2,303	9.0	13,711/92,410	14.8	1.09 (0.88–1.35)		.426	<.001
2011	132/1,493	8.8	271/2,728	9.9	13,408/94,958	14.1	1.14 (0.91–1.41)		.248	<.001
Overall	1,260/15,631	8.1	890/9,372	9.5	60,658/422,463	14.4	1.20 (1.09–1.31)		<.001	<.001

TABLE 4

Pregnancy rates, odd ratios, ranges, and median and mean values per cycle and transfer following slow freezing or vitrification.

Year	Pregnancy rate/cycle, % (n/n)			Median % (range %)			Pregnancy rate/transfer % (n/n)			Median % (range %)		
	SF	VT	OR (95% CI), SF (SF = 1) vs. VT	SF	VT	P value	SF	VT	OR (95% CI), SF (SF = 1) vs. VT	P Value	SF	VT
2007	10.5 (254/2,426)	12.9 (73/568)	1.26 (0.96–1.67)	6.7 (0–40)	0.0 (0–50)	.101	13.1 (254/1,945)	15.1 (73/483)	1.19 (0.89–1.57)	.236	4.8 (0–100)	0.0 (0–50)
2008	11.9 (312/2,625)	13.7 (90/659)	1.17 (0.91–1.51)	9.2 (0–100)	0.0 (0–53)	.215	14.6 (312/2,136)	17.1 (90/526)	1.21 (0.93–1.56)	.151	12.7 (0–100)	0.0 (0–40)
2009	12.4 (238/1,916)	16.5 (196/1,186)	1.40 (1.14–1.71)	5.1 (0–50)	0.0 (0–100)	.001	15.0 (238/1,589)	20.7 (196/946)	1.48 (1.20–1.83)	<.001	8.1 (0.57–100)	0.0 (0–100)
2010	13.8 (151/1,097)	13.7 (184/1,344)	0.99 (0.79–1.25)	6.3 (0–100)	8.3 (0–50)	.958	16.9 (151/895)	17.2 (184/1,067)	1.03 (0.81–1.30)	.827	8.3 (0–100)	11.1 (0–100)
2011	13.8 (119/863)	14.2 (233/1,641)	1.03 (0.81–1.31)	6.0 (0–100)	8.3 (0–100)	.793	16.7 (119/711)	17.9 (233/1,301)	1.09 (0.85–1.38)	.508	17.6 (0–100)	11.8 (0–100)
All	12.0 (1,074/8,927)	14.4 (776/5,401)	1.23 (1.11–1.35)	7.7 (0–50)	6.7 (0–100)	<.001	14.8 (1,074/7,276)	18.0 (776/4,323)	1.26 (1.14–1.40)	<.001	11.5 (0–50)	11.0 (0–100)

CONCLUSIONI



STORIA: Negli anni '70 Congelamento Lento e negli anni '80 la vitrificazione

OVOCITI: DANNI → MEMBRANA, GRANCORTICALI,
CITO MEIOTICO, Istoni, Rotture al DNA

Principio e TECNICHE: minimizzare il danno a membrane ed organelli mediante una nucleazione controllata o mediante il passaggio ad uno stato vitroso senza cristallizzazione

RISULTATI: Ad oggi la tecnica d'elezione è la vitrificazione, non è più ritenuta sperimentale e dà risultati in linea con gli ovociti freschi con migliaia di nati

APPLICAZIONI: ovo-D, Accumulo di ovociti nelle Low resp., Conservazione della fertilità (cause mediche o non)

CRITICITÀ: Efficacia, Sicurezza e Difficoltà ad individuare fattori prognostici nella selezione ovocitaria finalizzata alla resa successiva

Realtà Italiana: Stabilizzazione dei risultati clinici tra le 2 tecniche e tra Scongelo Ovocitario ed embrionario. Superiorità Outcome clinico della VT (2007-2011)



www.cartoline.net

Grazie per l'attenzione!

..dal 01/11/2010 al 01/05/2014..
con sistema aperto "surface»..

Ciclo Devitrif Ovocit	105
Ciclo Devitrif Ovocit (paz<38aa)	100
Grav.Cl. /Ciclo Devitrif. (paz< 38aa)	(18/100) 18%
Grav.Cl. /ET (paz< 38aa)	(18/86) 21%
Singole	14 (77,8%)
Bigem + Trigem	2 (11,1%) + 2 (11,1%)
Nati	13