



con il patrocinio  
della



con il patrocinio  
dell'



**sios**  
Società Italiana di  
Oncologia Sperimentale



ORDINE PROVINCIALE  
E MEDICO RIPRODUZIONE  
P. M. ... GENOVA



**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 tessuto ovarico

Dott.ssa F. Salvagno - Dott.ssa V. Stabile

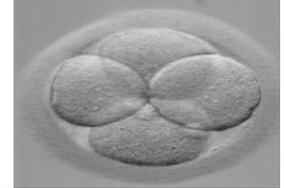
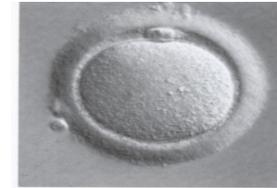
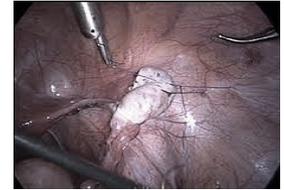
*SSD Fisiopatologia della Riproduzione e PMA  
Ospedale Sant'Anna, Università di Torino*



# ***STRATEGIE DI PRESERVAZIONE DELLA FERTILITA' FEMMINILE***

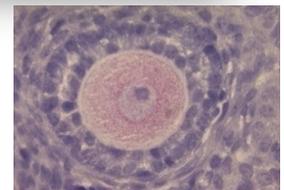
**TECNICHE  
CONSOLIDATE**

- **Trasposizione ovarica**
- **Crioconservazione di ovociti maturi**
- **Crioconservazione di embrioni**



**TECNICHE  
SPERIMENTALI**

- **Soppressione ovarica con analoghi del GnRH durante le terapie gonadotossiche**
- **Crioconservazione di tessuto ovarico**



# Crioconservazione di tessuto ovarico



**PRELIEVO DI  
TESSUTO  
OVARICO**



**TRASPORTO**



**PREPARAZIO  
NE DEI  
CAMPIONI**



**CONGEL  
AMENTO**

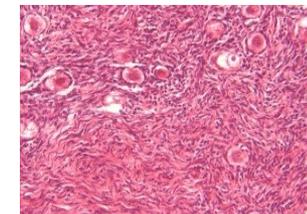
**CRIOCONSERVAZIONE**



**Thawing test**

**SCONGELAMEN  
TO**

**TRAPIANTO**



# *Candidate a crioconservazione di tessuto ovarico*

- ❑ donne (e bambine) di eta' inferiore a 38 anni che a causa di un tumore maligno si debbano sottoporre a trattamenti chemioterapici e/o radioterapici
- ❑ donne che debbano rinviare la gravidanza a causa di malattie generali non tumorali che richiedano terapie gonadotossiche, nei rari casi in cui non sia possibile procedere a stimolazione ovarica e crioconservazione di ovociti
- ❑ bambine affette dalla Sindrome di Turner
- ❑ donne affette da malattie benigne dell'ovaio (?)

# *Crioconservazione di tessuto ovarico*

**PRO**

- Elevato numero di follicoli
- Follicoli primordiali poco criosensibili
- Indipendenza dal ciclo mestruale
- Non necessità di stimolazione ovarica
- Ripresa della funzione endocrina
- Fattibilità nelle prepuberi
- Organizzabilità a distanza



**CONTRO**

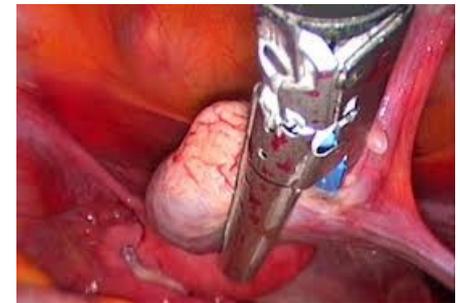
- Necessita' di interventi chirurgici
- Possibili problemi di ri-vascolarizzazione
- Rischio di re-impianto di cellule neoplastiche

# *Prelievo di tessuto ovarico*

**BIOPSIE MULTIPLE**

**RESEZIONE DI  
CORTICALE**

**OVARIECTOMIA**



***Solitamente il prelievo viene effettuato in laparoscopia, a meno che vi sia l'indicazione concomitante ad un intervento laparotomico***

# Trasporto

**Il tessuto ovarico adeguatamente trasportato (terreno di trasporto tamponato a 4°C) rimane stabile fino a 20 ore senza subire danni significativi.**

(Andersen CY et al. 2008; Dittrich R et al. 2012)

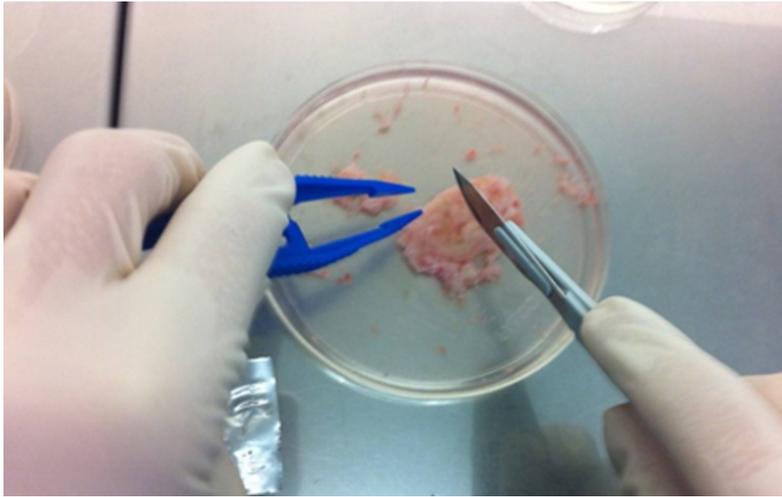


*Fertil Steril.* 2012 Feb;97(2):387-90. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.11.047. Epub 2011 Dec 16.

**Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation.**

Dittrich R<sup>1</sup>, Lotz L, Keck G, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, van der Ven H, Montag M.

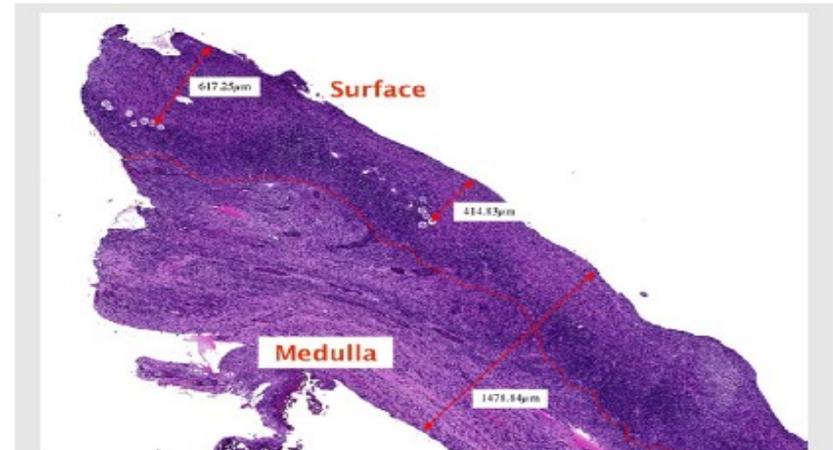
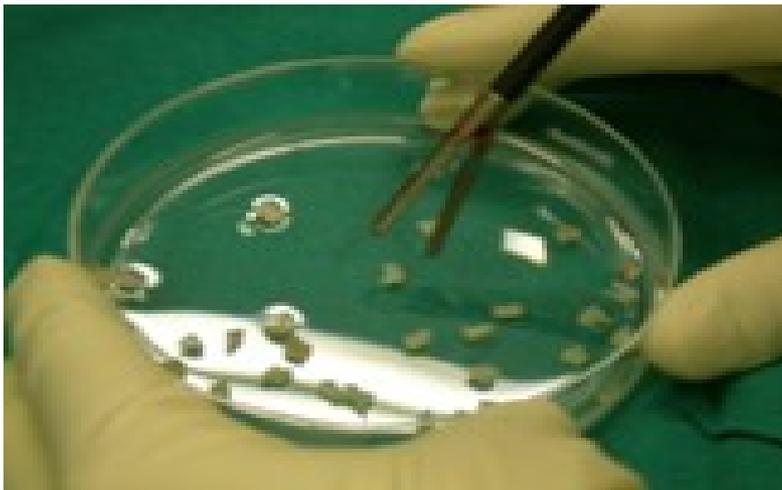
# Preparazione del campione



## IN LABORATORIO:

1. Separazione della corticale ovarica dalla midollare

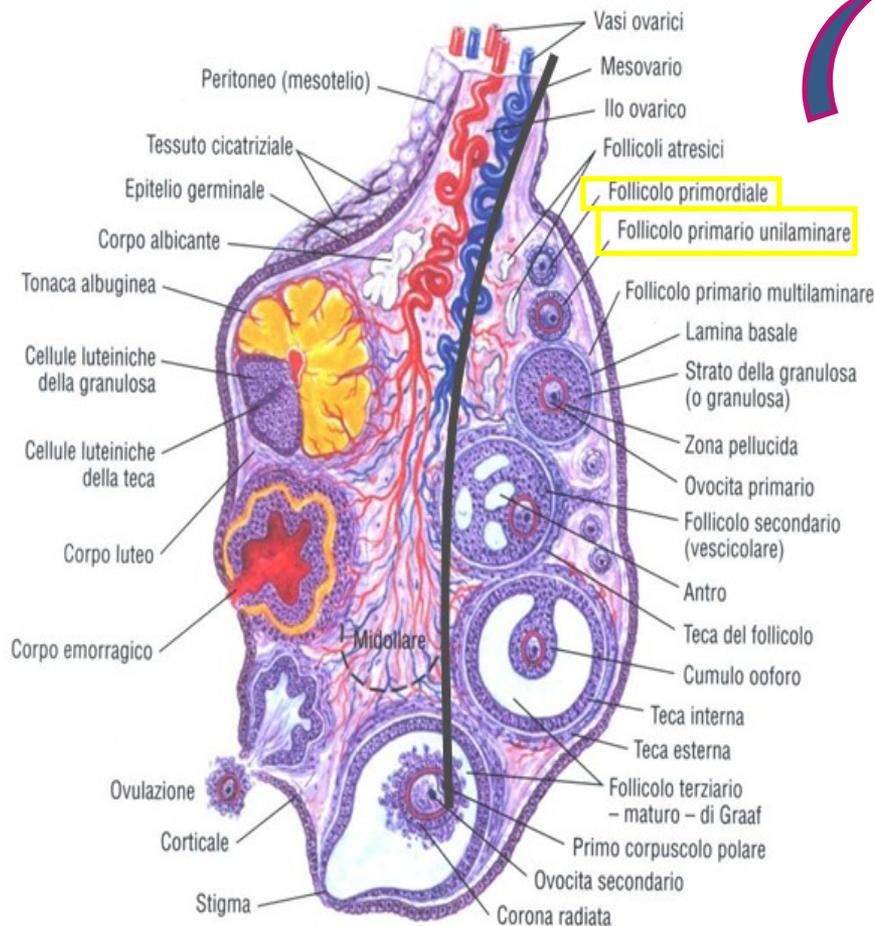
2. Sezionamento in frammenti di piccole dimensioni (spessore!!!)



Ovarian cortical biopsy demonstrating the distance between the mesothelium and primordial follicles, ranging from 414  $\mu\text{m}$  to 617  $\mu\text{m}$ .

Donnez. Transplantation of ovarian tissue. *Fertil Steril* 2013.

# Congelamento



I follicoli primordiali mostrano una elevata resistenza ai danni da congelamento poiché gli ovociti in essi contenuti:

1. Sono in uno stato di relativa quiescenza metabolica
2. Mancano di fuso meiotico, zona pellucida e granuli corticali
3. Sono facilmente penetrabili dai crioprotettori

**TASSO DI SOPRAVVIVENZA POST-  
CONGELAMENTO: 70-80%**

# Congelamento



4. Metodica standard di congelamento: **slow freezing**. Esposizione graduale a concentrazioni crescenti di crioprotettori.
5. Caricamento in supporti di congelamento dedicati e trasferimento in congelatore programmabile
6. Seeding manuale (alla temperatura di  $-8^{\circ}\text{C}$ ) e stoccaggio in azoto liquido.

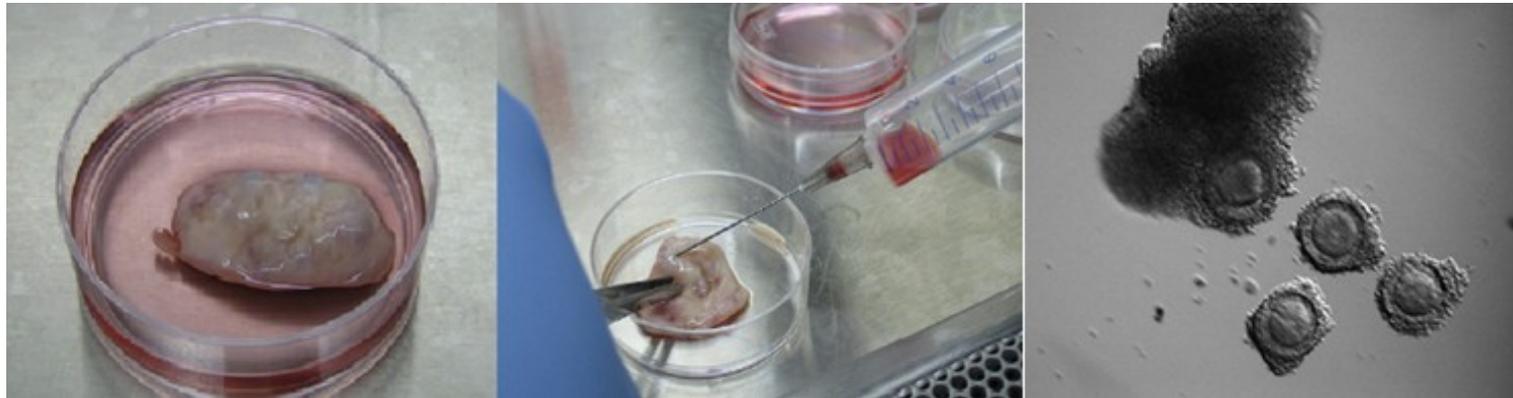


Invio di uno/due frammenti all'esame istologico per la determinazione della conta follicolare (N.foll/mm<sup>3</sup>)

# *Crioconservazione di tessuto ovarico: Recupero di GV da tessuto ovarico e IVM*

## **Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation**

*Jack Y. J. Huang, M.D., Togas Tulandi, M.D., M.H.C.M., Hananel Holzer, M.D., Seang Lin Tan, M.D., M.B.A., and Ri-Cheng Chian, Ph.D.*



[Hum Reprod.](#) 2014 Feb;29(2):276-8. doi: 10.1093/humrep/det420. Epub 2013 Dec 9.

### **First pregnancy and live birth resulting from cryopreserved embryos obtained from in vitro matured oocytes after oophorectomy in an ovarian cancer patient.**

[Prasath EB](#)<sup>1</sup>, [Chan ML](#), [Wong WH](#), [Lim CJ](#), [Tharmalingam MD](#), [Hendricks M](#), [Loh SF](#), [Chia YN](#).

#### **Abstract**

In vitro maturation (IVM) of immature oocytes retrieved from surgically resected ovaries has been proposed as a method of fertility preservation in ovarian cancer patients undergoing definitive surgery. While there had been several reports of successful derivation of mature oocytes and or embryos, there have been no reports as yet of successful pregnancies. In this case report, we present a pregnancy and live birth from a young patient, with stage IIIc ovarian cancer, who had undergone fertility sparing surgery. The immature oocytes recovered after oophorectomy were fertilized after IVM. The embryos obtained were cryopreserved and later transferred to achieve a singleton healthy pregnancy leading to a live birth.

# *Thawing test*

Scongelamento pre-reimpianto per effettuare esame istologico e **confermare l'assenza di contaminazione da parte di cellule neoplastiche**

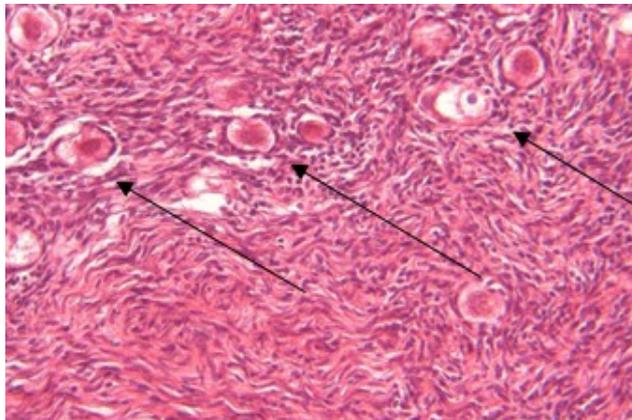


**Parere favorevole da parte dell'anatomia patologica**

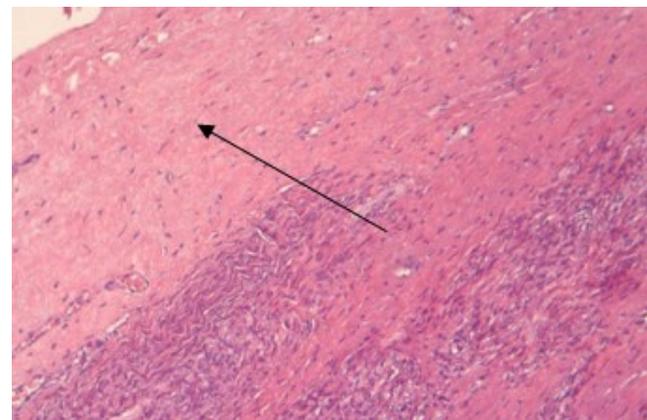


**Reimpianto ortotopico**

**Sezione istologica corticale ovarica post-congelamento**

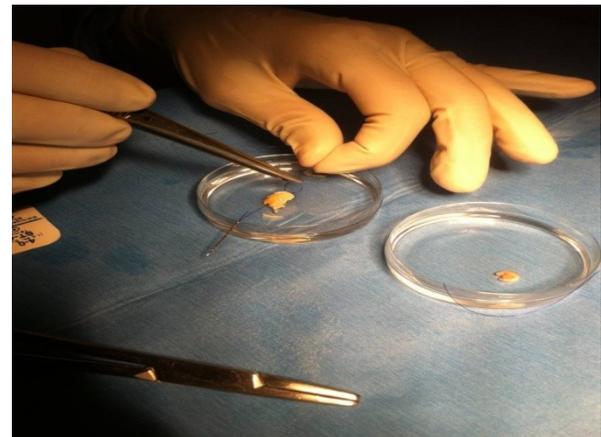
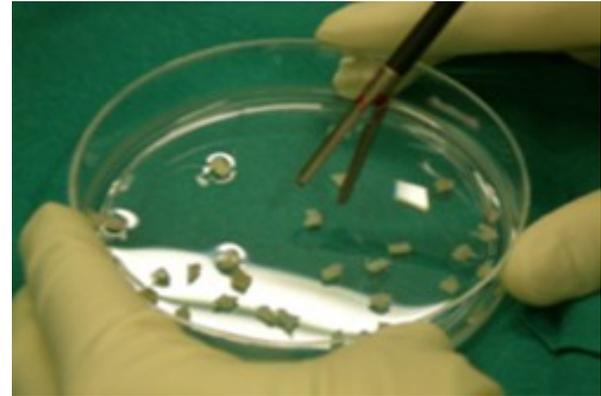


**Sezione istologica ovaio residuo post-chemioterapia**



# *Scongelamento*

- ② Ultimo step critico della procedura di crioconservazione
- ② Esposizione dei frammenti per alcuni secondi a T ambiente e in seguito immersione in bagni alla temperatura di 30°C
- ② Passaggio in soluzioni di scongelamento contenenti concentrazioni decrescenti di crioprotettori
- ② Trasporto dei frammenti alla sala operatoria in terreno di coltura tamponato



**AUTOTRAPIANTO  
ORTOTOPICO**

# *Crioconservazione di tessuto ovarico: Rischio oncologico*

**Possibilità di reintrodurre nell'organismo cellule maligne in caso di micro-MTS ovariche**



JVM

Eppig & O'Brien 1996



**Trapianto di follicoli isolati**

Dolmans 2006; Dath 2011



# *Rischio oncologico*

## *Trapianto di follicoli isolati*

La lamina basale che circonda i follicoli ovarici rappresenta una **barriera fisica** che li isola dal compartimento stromale e dai vasi sanguigni.

1

- Recupero della corticale ovarica

2

- Dissezione meccanica / enzimatica con isolamento dei follicoli ovarici

3

- Coltura dei follicoli in matrici che ne assicurano la sopravvivenza e la crescita

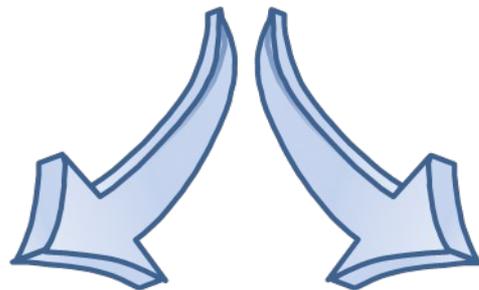
- **Difficoltà di manipolazione dei follicoli primordiali umani**
- **Messa a punto di sistemi di coltura 3D e dei fattori**

*Fertil Steril*. 2014 Apr;101(4):1149-56. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.025. Epub 2014 Jan 23.

**A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold.**

*Luyckx V<sup>1</sup>, Dolmans MM<sup>2</sup>, Vanacker J<sup>1</sup>, Legat C<sup>1</sup>, Fortuño Moya C<sup>1</sup>, Donnez J<sup>3</sup>, Amorim CA<sup>1</sup>.*

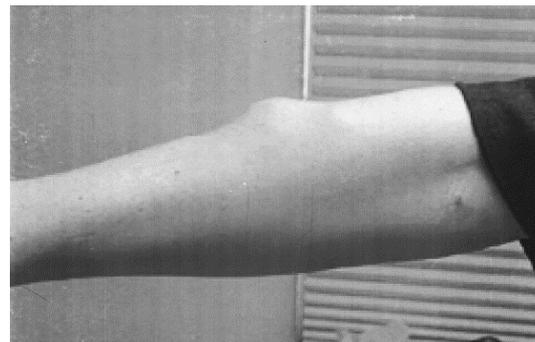
# *Trapianto*



**ORTOTOPICO**



**ETEROTOPICO**



# Trapianto ortotopico vs eterotopico

	Trapianto eterotopico	Trapianto ortotopico
Vantaggi	<ul style="list-style-type: none"><li>• Non ci sono limitazioni al numero di frammenti da trapiantare</li><li>• Procedura di trapianto facile</li><li>• Monitoraggio della crescita follicolare e prelievo ovocitario semplici</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Possibilità di concepimento naturale</li><li>• Ripresa della fertilità ampiamente dimostrata</li><li>• Ambiente favorevole allo sviluppo follicolare</li></ul>
Svantaggi	<ul style="list-style-type: none"><li>• Una sola gravidanza</li><li>• Necessità di IVF</li><li>• Effetto sconosciuto dell'ambiente locale</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Numero di frammenti trapiantati limitato</li><li>• Procedura di trapianto invasiva</li></ul>

# *Primi nati da trapianto eterotopico*

- Paziente affetta da **tumore a cellule della granulosa sottoposta ad ovariectomia bilaterale**
- Crioconservazione di tessuto ovarico
- **Trapianto sottocutaneo a livello della parete addominale anteriore**
- 2 anni dopo **Il trapianto** di 30 strisce di corticale ovarica a livello della parete addominale destra e sinistra
- **OPU transaddominale**
- Recupero di 2 ovociti e trasferimento in utero di 2 embrioni con ottenimento di una **GRAVIDANZA GEMELLARE**

# *Gravidanze da trapianto ortotopico*

**TOTALI** n 39

**NATI VIVI** n 26

**GRAVIDANZE ONGOING** n 4

**GRAVIDANZE ECTOPICHE** n 1

**ABORTI** n 7

**IVG** n 2





# Bambini nati da trapianto ortotopico

## Gravidanze spontanee

56%

n 14

<i>Donnez</i>	++++
<i>Demesteer</i>	++
<i>e</i>	++
<i>Andersen</i>	++
<i>Silber</i>	+
<i>Roux</i>	+
<i>Dittrich</i>	+
<i>Revelli</i>	+
<i>Le Roux</i>	

## Gravidanze IVF

n 11

44%

<i>Donnez</i>	++
<i>Meirow</i>	+
<i>Andersen</i>	++
<i>Piver</i>	+
<i>Sanchez</i>	++
<i>Revel</i>	( <del>g</del> gemelli)
<i>Callejo</i>	+
<i>Burmeister</i>	+

# Trapianto ortotopico

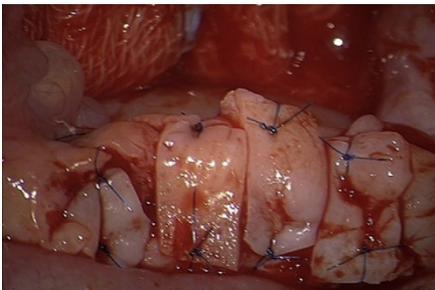
Se è presente almeno un ovaio



Decorticazione dell'ovaio  
residuo per avere accesso alla  
midollare e ai suoi vasi



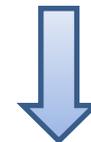
Posizionamento dei frammenti  
dentro o sopra la midollare ovarica



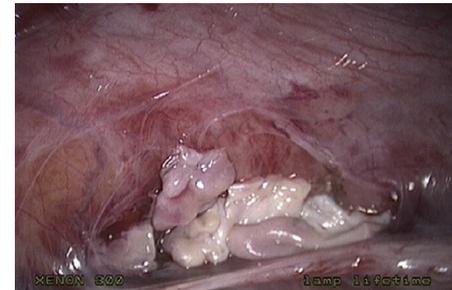
Se entrambe le ovaie sono assenti



Creazione di una o più tasche  
peritoneali



Posizionamento dei frammenti nella  
tasca



# Trapianto ortotopico

## Laparotomico

Sanchez et al. 2010

Revel et al. 2011

Silber et al. 2010

## Laparoscopico

Oktay et al. 2001

Donnez et al. 2004

Meirow et al. 2005

Demeestere et al. 2007

Piver et al. 2009

Roux et al. 2010

Dittrich et al. 2012

Revelli et al. 2013

Callejo et al. 2013

## Combinato LPS-LPT

Andersen et al. 2008



Torino, Italy

# La nostra esperienza



## ILPS

- Decorticazione delle ovaie atrofiche e creazione delle tasche peritoneali





Torino, Italy

# *La nostra esperienza*



## ILPS

- Decorticazione delle ovaie atrofiche e creazione delle tasche peritoneali
  - Salpingocromoscopia





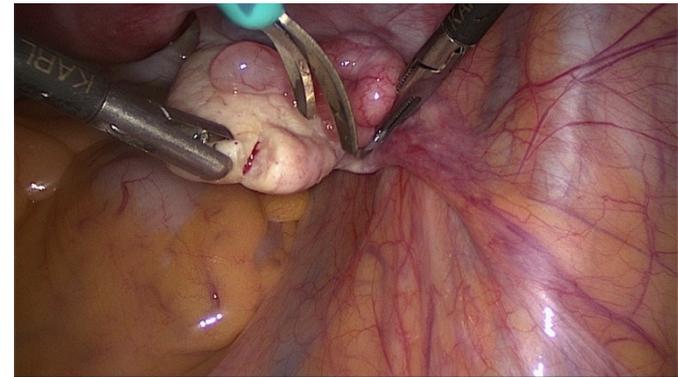
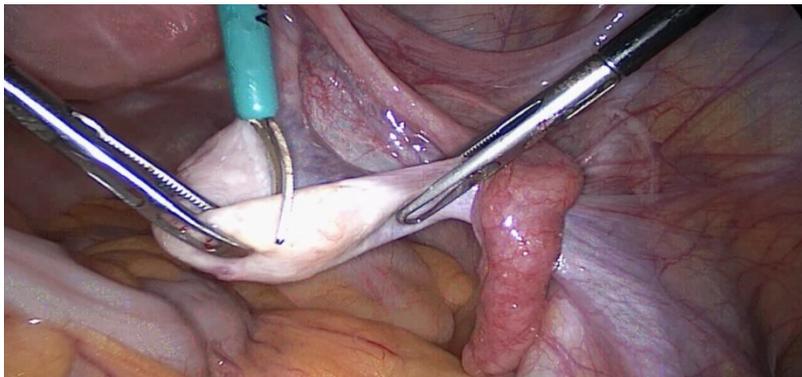
Torino, Italy

# *La nostra esperienza*



## ILPS

- Decorticazione delle ovaie atrofiche e creazione delle tasche peritoneali
  - Salpingocromoscopia
  - Biopsie delle ovaie rimanenti





Torino, Italy

# La nostra esperienza

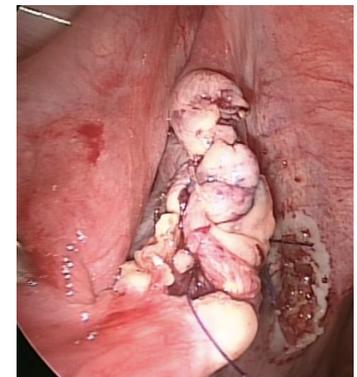
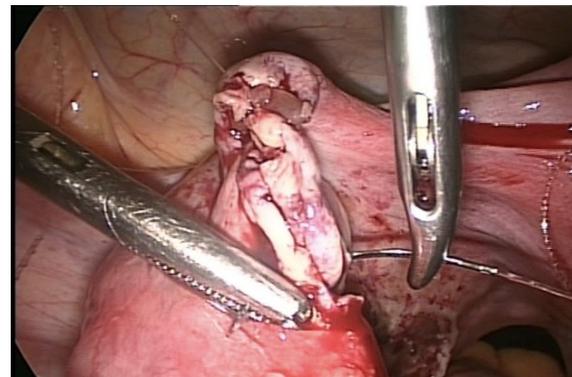
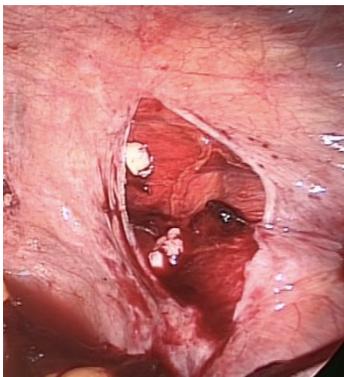
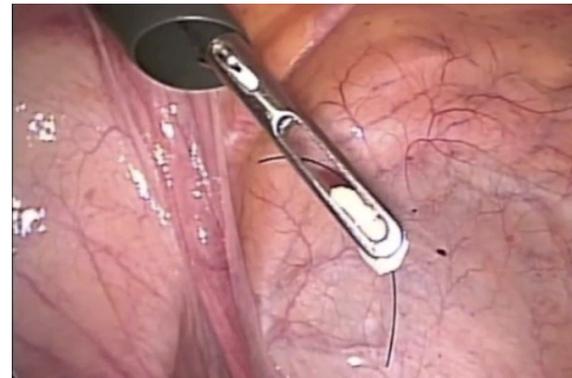


## II LPS

## Trapianto dei frammenti scongelati

Nella midollare ovarica

Nelle tasche peritoneali





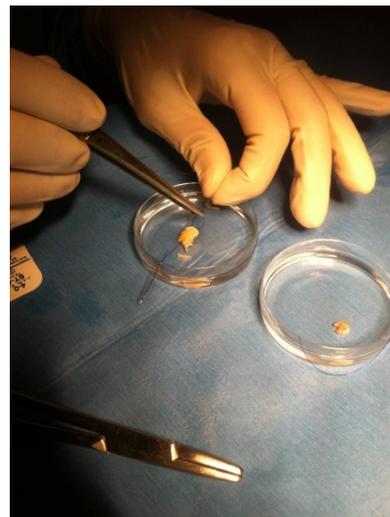
Torino, Italy

# La nostra esperienza



## Innovazione

Utilizzo di un filo di sutura ecogenico a lento riassorbimento (PDS 4.0™ Ethicon) come guida in cui sono infilati i frammenti scongelati



## Il razionale

- ✓ Agevola l'inserimento dei frammenti attraverso i trocars operativi e ne facilita il posizionamento nel sito d'impianto impedendone la dislocazione
- ✓ È repere ecografico dei siti esatti in cui è stato posto il tessuto scongelato



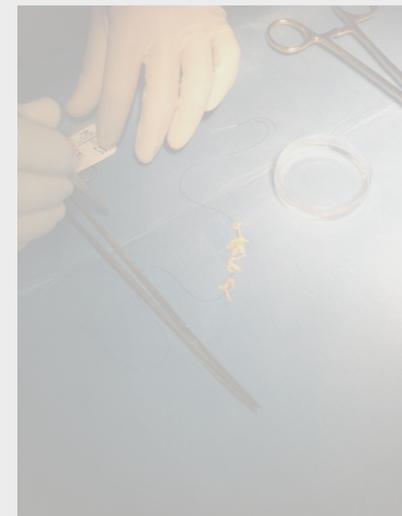
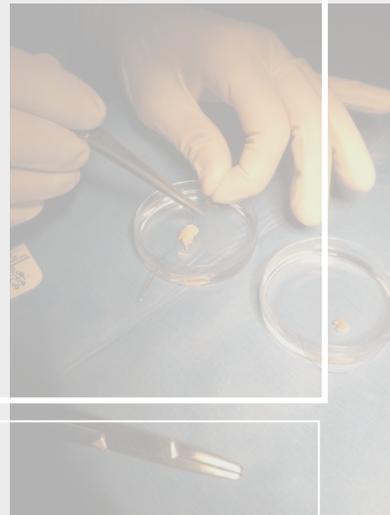
Torino, Italy

# La nostra esperienza



## Innovazione

Utilizzo di un filo di sutura ecogenico a lento riassorbimento (PDS 4.0™ Ethicon) come guida in cui sono infilati i frammenti scongelati



## Il razionale

- ✓ Agevola l'inserimento dei frammenti attraverso i trocars operativi e ne facilita il posizionamento nel sito d'impianto impedendone la dislocazione
- ✓ È repere ecografico dei siti esatti in cui è stato posto il tessuto scongelato

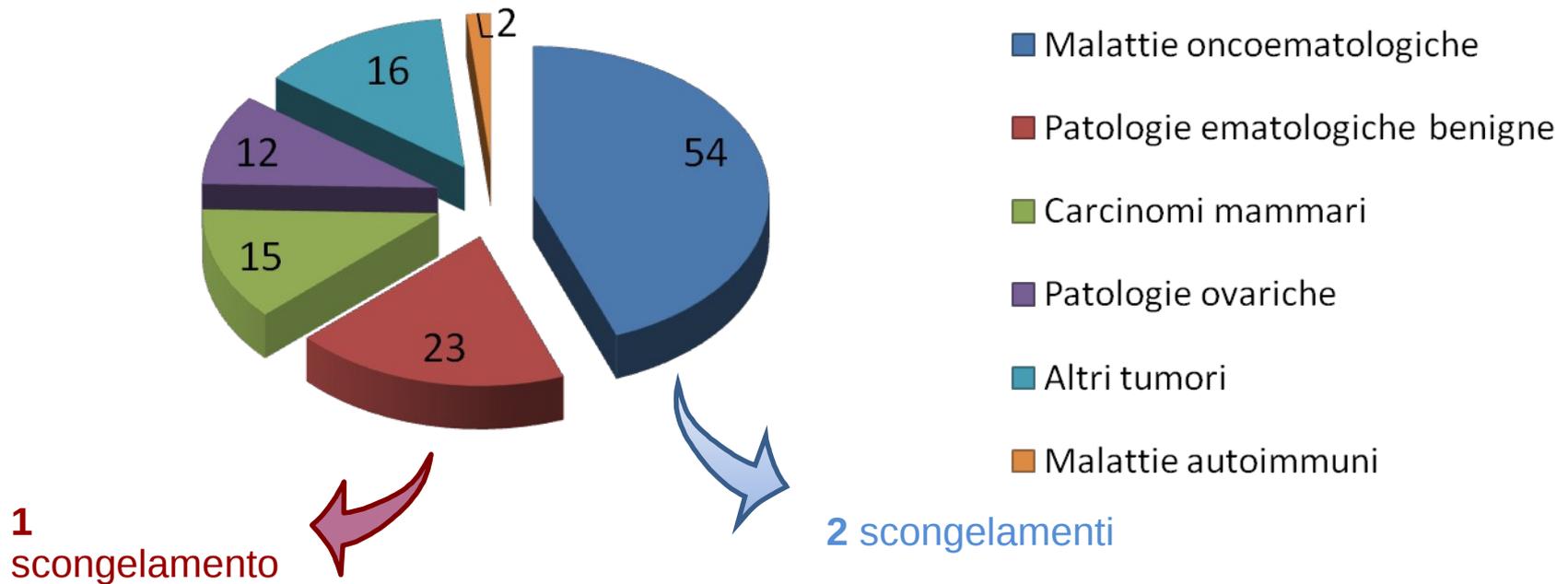


Torino, Italy

# La nostra esperienza



122 bambine e donne sottoposte a crioconservazione di tessuto ovarico dal 2000 ad oggi



Età media: 17.43±9.39



Torino, Italy

# La nostra esperienza



21 anni  
Talassemia  
intermedia

Recupero di  
tessuto ovarico e  
crioconservazione

2001

Trapianto  
ortotopico

2010

16  
mesi



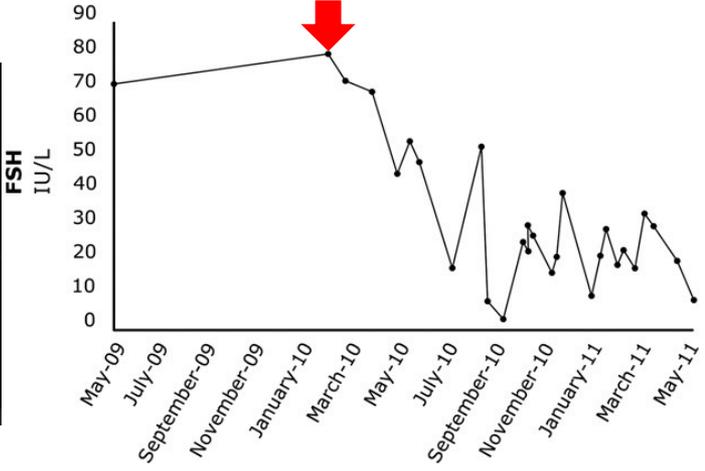
3.5  
mesi

Gravidanza  
spontanea

Ripresa funzione  
endocrina



TC a 39 settimane  
Per sproporzione fetto pelvica  
AURORA, 3,670 gr  
Apgar: 9/9



Gonadotropina corionica (hCG)  
(Nuovo metodo CLIA dal 23/06/2011)

8 978.8

7 sett 15711 - 131052  
8 sett 30843 - 170444

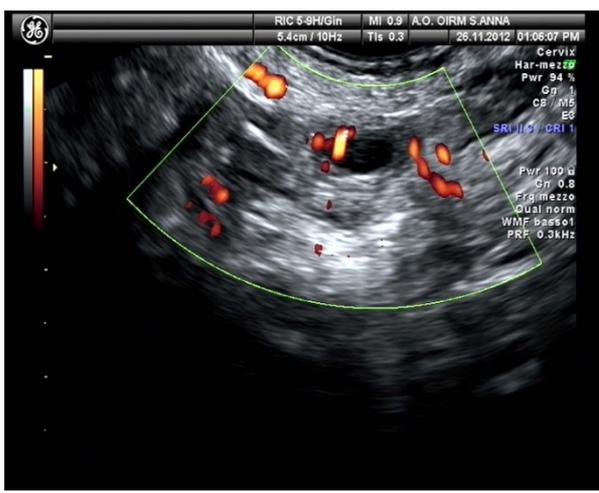
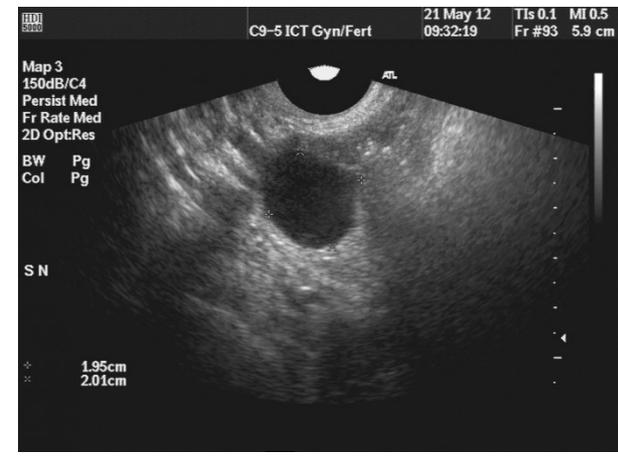


Torino, Italy

# La nostra esperienza



- P.D. nata nel 1973
- Nel 2001 diagnosi di Linfoma di Hodgkin
- Nel 2001 prelievo di corticale ovarica (28 anni)
- Dal 2003 POI post-chemioterapia
- Dicembre 2011: ri-trapianto
- Da maggio 2012: ovulazioni spontanee



- T.B. nata nel 1973
- Nel 2005 diagnosi di Linfoma di Hodgkin
- Nel 2005 prelievo di corticale ovarica (32 anni)
- Dal 2007 POI post-chemioterapia
- Luglio 2012: ri-trapianto
- Ottobre 2012: neo-vascularizzazione del tessuto ri-trapiantato
- Da novembre 2012: ovulazioni spontanee

# *Conclusioni*

- ❑ L'efficacia della crioconservazione di tessuto ovarico in termini di ripresa della funzione ovarica e ripristino della fertilità è stata provata, sebbene la tecnica sia tuttora sperimentale
- ❑ Non è facile stabilire quale approccio chirurgico offra i migliori risultati
- ❑ La durata del tessuto ovarico trapiantato sembra essere limitata nel tempo
- ❑ La maggioranza delle donne che hanno ottenuto una gravidanza avevano meno di 30 anni al momento del congelamento.
- ❑ Tutti i parti singoli sono avvenuti dopo le 37 settimane di gravidanza
- ❑ Tutti i bambini nati sono in BUONA SALUTE



# *Conclusioni*

- **La preservazione della fertilità è un tema di fondamentale importanza per tutte le giovani donne a rischio di insufficienza ovarica precoce**
- **Un counselling precoce e adeguato dovrebbe essere garantito a tutte le pazienti a rischio di perdere la propria fertilità**



*Preserving Hope*

**Grazie per l'attenzione**



**FERTISAVE Team**

# Programma FERTISAVE

*Centro di Fisiopatologia della Riproduzione e PMA  
Via Ventimiglia 3, 10126, Torino*

*Tel: Ambulatorio 011.3134411 (lunedì-venerdì, ore 10.30-15.00)*

*Laboratorio 011.3134228*

*Fax 011.3134120*

*E-mail: [progettofertisave@yahoo.it](mailto:progettofertisave@yahoo.it)*

*Sito: [www.progettofertisave.it](http://www.progettofertisave.it)*