



AZIENDA OSPEDALIERO - UNIVERSITARIA
Città della Salute e della Scienza di Torino



ALLEGATO 2

SEDE LEGALE: Corso Bramante, 88/90 - 10126 Torino Centralino: tel. +39.011.6331633
P.I./Cod. Fisc. 10771180014 www.cittadellasalute.to.it
- Molinette, Dermatologico S. Lazzaro, S. Giovanni Antica Sede - centr. tel. +39.0116331633
- CTO, Istituto Chirurgico Ortopedico Regina Maria Adelaide - centr. tel. +39.0116933111
- Infantile Regina Margherita, Ostetrico Ginecologico S. Anna - centr. tel. +39.0113134444

PRESIDIO SANT'ANNA - DIPARTIMENTO DI GINECOLOGIA E OSTETRICIA
Direttore: Dott. Daniele Farina
Corso Spezia 60 – Torino
SCDU Clinica Universitaria Ostetrico-Ginecologica 1
Direttore: Prof.ssa Chiara Benedetto

Fisiopatologia della Riproduzione e PMA
Responsabile: Prof. Alberto Revelli
Via Ventimiglia, 3 – 10126 Torino
Tel. 011 3134411 – Fax. 011 3134120

Programma FERTISAVE

Programma di preservazione della fertilità femminile

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

Tel. Laboratorio 011.3134228

Fax 011.3134120

E-mail: progettofertisave@yahoo.it

SEDE LEGALE: Corso Bramante, 88/90 - 10126 Torino Centralino: tel. +39.011.6331633
P.I./Cod. Fisc. 10771180014 www.cittadellasalute.to.it
- Molinette, Dermatologico S. Lazzaro, S. Giovanni Antica Sede - centr. tel. +39.0116331633
- CTO, Istituto Chirurgico Ortopedico Regina Maria Adelaide - centr. tel. +39.0116933111
- Infantile Regina Margherita, Ostetrico Ginecologico S. Anna - centr. tel. +39.0113134444

PRESIDIO SANT'ANNA - DIPARTIMENTO DI GINECOLOGIA E OSTETRICIA
Direttore: Dott. Daniele Farina
Corso Spezia 60 – Torino
SCDU Clinica Universitaria Ostetrico-Ginecologica 1
Direttore: Prof.ssa Chiara Benedetto

Fisiopatologia della Riproduzione e PMA
Responsabile: Prof. Alberto Revelli
Via Ventimiglia, 3 – 10126 Torino
Tel. 011 3134411 – Fax. 011 3134120

Equipe

Ambulatorio Fisiopatologia della Riproduzione e PMA

Responsabile: prof. Alberto Revelli

Medici strutturati:

Dr. Gianluca Gennarelli

Dr.ssa Luisa Delle Piane

Dr.ssa Valentina Rovei

Dr.ssa Francesca Salvagno

Medici Specializzandi

Dr.ssa Fidalma Boninu

Dr.ssa Nicole Brunod

Dr.ssa Claudia Casato

Dr.ssa Sara Cesarano

Dr.ssa Luisa Cravero

Dr.ssa Bernadette Evangelisti

Dr.ssa Sara Leoncini

Dr.ssa Noemi Mercaldo

Dr. Alessandro Ruffa

Dr.ssa Carlotta Scarafia

Dr.ssa Marta Sestero

Psicologa

Dr.ssa Alessandra Razzano

Personale infermieristico

Ost. Maria Idea Gristina

Inf. Antonietta Ciminelli

Inf. Pamela Luisa Gallo

Oss Giulia Battigaglia

Oss Antonina Pannizzo

Laboratorio FIVER

Responsabile: dr.ssa Cinzia Racca

Dr.ssa Simona Ochetti

Tecnico di Laboratorio Biomedico Maria Luisa Rullo

Dr.ssa Francesca Evangelista

Dr. Stefano Canosa

Dr.ssa Carlotta Paschero

Dr.ssa Alessandra Nizzi

Dr.ssa Federica Zullo

Personale infermieristico

Inf. Lucia Caroleo

Inf. Anna Genghi

Oss. Stella Onorato

Introduzione

La preservazione della fertilità è un tema di interesse crescente in ragione del numero sempre più elevato di casi di insufficienza ovarica precoce.

Tale patologia ha infatti subito un incremento, soprattutto a causa dell'aumento di incidenza di numerosi tipi di tumore (es. leucemie, linfomi, cancro della mammella, ecc.) nei soggetti giovani e del miglioramento delle possibilità terapeutiche disponibili per fronteggiare tali malattie.

A fronte di più ampie prospettive di guarigione completa è sempre più alta la percentuale di pazienti che vanno incontro ad una menopausa precoce e soprattutto ad una compromissione irreversibile della fertilità a causa della tossicità dei trattamenti antitumorali.

La chemioterapia comporta un rischio di menopausa precoce o di riduzione della riserva ovarica, la probabilità delle ovaie di subire un danno dipende dal tipo di farmaco utilizzato, dalla dose cumulativa e dall'età della paziente.

L'incidenza di amenorrea post-chemioterapia è estremamente variabile ed inoltre non rappresenta il miglior indicatore di infertilità, in quanto è possibile essere di fronte ad un'infertilità anche in presenza di cicli mestruali conservati ed allo stesso modo è possibile avere ovulazioni sporadiche con possibilità di concepimento in pazienti amenorroiche.

Allo stesso modo anche la radioterapia può provocare una riduzione del patrimonio follicolare, l'effetto sterilizzante della radioterapia dipende dall'età della paziente, dalla dose di radiazioni utilizzate e dal campo di irradiazione.

La preservazione della fertilità può essere offerta a tutte le pazienti giovani candidate con buona probabilità ad una menopausa precoce o ad una perdita delle capacità riproduttive.

Pazienti candidate a preservazione della fertilità

Le pazienti a rischio di insufficienza ovarica precoce da sottoporre a preservazione della fertilità sono:

- a) donne (e bambine) di età inferiore a 40 anni che a causa di un **tumore maligno** si debbano sottoporre a **trattamenti chemioterapici e/o radioterapici** in grado di alterare irreversibilmente il patrimonio di ovociti, sia nel senso della loro distruzione, sia in quello dell'induzione di anomalie genetiche a carico del DNA degli ovociti stessi (effetto mutageno delle radiazioni e di alcuni farmaci antitumorali);
- b) donne che debbano rinviare la gravidanza a causa di **malattie generali non tumorali** che possono essere curate, ma solo con farmaci potenzialmente tossici per l'ovaio o teratogeni;

c) donne affette da **malattie benigne dell'ovaio** (ad esempio endometriosi ovarica grave o cisti ovariche bilaterali) che possono determinare nel tempo la graduale distruzione del tessuto ovarico contenente gli ovociti;

d) pazienti affette da **patologie genetiche** che possano compromettere la fertilità, in particolare bambine affette da **Sindrome di Turner** prima del completo esaurimento della riserva ovarica, bambine e giovani donne con mosaicismo per sindrome di Turner e riserva ovarica ridotta ma ancora presente, pazienti con premutazione del gene FRAXA (gene responsabile della sindrome dell'X fragile) con riserva ovarica ridotta

Tecniche di preservazione della fertilità femminile

Le tecniche tradizionalmente impiegate per la preservazione della fertilità femminile sono l'ovaropessi, la crioconservazione di embrioni e la crioconservazione di ovociti.

La crioconservazione di tessuto ovarico è una tecnica più nuova ed ancora sperimentale di preservazione della fertilità.

1. L'ovaropessi, ovvero la trasposizione chirurgica delle gonadi femminili al di fuori della pelvi viene effettuata nelle pazienti in cui è prevista un'irradiazione pelvica ma tale tecnica, pur riducendo l'esposizione delle gonadi alle radiazioni, non garantisce una completa protezione delle ovaie.

2. La crioconservazione di embrioni richiede invece la presenza di un partner maschile stabile e necessita di una stimolazione ovarica volta ad ottenere un'ovulazione multipla ed un prelievo ovocitario ecoguidato. Tale tecnica comporta implicazioni sia dal punto di vista etico, sia legale, visto che ad oggi per la legge italiana non è praticabile nelle pazienti oncologiche.

3. La crioconservazione ovocitaria comporta una stimolazione ovarica ed un prelievo ovocitario ecoguidato.

4. La crioconservazione di tessuto ovarico prevede un intervento chirurgico laparoscopico per il prelievo di biopsie di corticale ovarica destinate alla crioconservazione e il reimpianto dei frammenti di tessuto ovarico crioconservati.

La tecnica di preservazione da preferire dipende dall'età della paziente, dalla eventuale concomitante necessità di un altro intervento chirurgico (ad esempio il prelievo di midollo osseo), dalla finestra temporale di cui si dispone prima dell'inizio delle terapie chemio-radioterapiche o immunosoppressive e dalle preferenze della paziente stessa.

Aspetti psicologici: significato e vissuti legati alla preservazione della fertilità

La proposta di preservare la fertilità, in un momento così critico della vita, è accolta dalle pazienti e dai familiari come uno “sguardo al futuro”, come un vero e proprio “investimento di vita”. Tale opportunità, infatti, si pone come una preziosa offerta in un contesto permeato da ansie e preoccupazioni relative alla propria salute e alla salvaguardia della stessa. Considerato il particolare momento di vita, in cui il Progetto Fertisave viene proposto, possono presentarsi delle criticità che rendono più difficile la scelta di aderirvi o meno per le donne e/o per i loro genitori.

Può capitare che la comprensione di aspetti tecnici, le tante informazioni ricevute, i timori inerenti le terapie di stimolazione/prelievo, unitamente allo sconvolgimento emotivo, possano rendere la decisione di preservare la propria fertilità più faticosa e meno percorribile.

Al fine di favorire scelte autonome e consapevoli e di offrire uno spazio ove anche le incertezze, i dubbi, le angosce possano trovare espressione e accoglienza, a tutte le donne viene offerto un colloquio psicologico contestualmente alla visita medica.

L'incontro con lo psicologo si pone come parte integrante dell'attività del Centro, come “uno spazio” dove si possa essere aiutati a ripensare, ridiscutere e risignificare l'esperienza attuale, favorendo la partecipazione attiva e consapevole nel proprio progetto di cura.

In relazione alle diverse necessità e alle richieste delle pazienti, le stesse potranno, eventualmente, essere messe in contatto con i Servizi di Psicologia presenti nelle strutture dove saranno affrontate le cure specifiche per la malattia. Verrà altresì lasciata disponibilità per ulteriori colloqui psicologico-clinici durante e dopo il percorso Fertisave.

Crioconservazione di ovociti per la preservazione della fertilità femminile in pazienti a rischio di esaurimento ovarico precoce.

La crioconservazione di ovociti umani è una tecnica utilizzata per preservare la fertilità di pazienti a rischio di insufficienza ovarica precoce ed infertilità, ma anche per ottimizzare i risultati dei cicli di fecondazione in vitro.

I vantaggi della crioconservazione ovocitaria consistono nel fatto che non richieda procedure invasive e non comporti rischi di contaminazione con cellule maligne nel caso di pazienti oncologiche, a differenza della crioconservazione di tessuto ovarico, inoltre la tecnica non comporta implicazioni etiche, al contrario del congelamento di embrioni, e rappresenta una tecnica consolidata dal momento che nel mondo sono più di 1000 i bambini sani nati da ovociti scongelati.

Il congelamento di cellule umane, per contro, comporta danni biologici da crioconservazione: l'ovocita è una cellula particolarmente sensibile ai danni da congelamento in relazione al basso rapporto superficie/volume e all'elevato quantitativo di acqua intracellulare. Gli altri svantaggi della crioconservazione di ovociti constano nel fatto che permette di criopreservare un numero limitato di gameti. Le tempistiche per la stimolazione ovarica necessaria al recupero degli ovociti da crioconservare implicano la necessità di almeno 10-15 giorni, mentre la necessità di iniziare la stimolazione in un momento preciso del ciclo mestruale può essere superata con alcuni accorgimenti.

Il protocollo qui illustrato prevede che si congelino e si conservino ovociti allo scopo di ottenere gravidanze omologhe (con ovociti appartenenti alla paziente e spermatozoi appartenenti al suo partner), in seguito a scongelamento degli stessi, fecondazione in vitro e successivo trasferimento in utero degli embrioni così ottenuti.

Pazienti candidate alla preservazione della fertilità mediante crioconservazione di ovociti

Le pazienti candidate a crioconservazione di ovociti sono:

- a) donne (e bambine) di età inferiore a 40 anni che a causa di un **tumore maligno** si debbano sottoporre a **trattamenti chemioterapici e/o radioterapici** in grado di alterare irreversibilmente il patrimonio di ovociti, sia nel senso della loro distruzione, sia in quello dell'induzione di anomalie genetiche a carico del DNA degli ovociti stessi (effetto mutageno delle radiazioni e di alcuni farmaci antitumorali);
- b) donne che debbano rinviare la gravidanza a causa di **malattie generali non tumorali** che possono essere curate, ma solo con farmaci potenzialmente tossici per l'ovaio o teratogeni;
- c) donne affette da **malattie benigne dell'ovaio** (ad esempio endometriosi ovarica grave o cisti ovariche bilaterali) che possono determinare nel tempo la graduale distruzione del tessuto ovarico contenente gli ovociti;
- d) pazienti affette da **patologie genetiche** che possano compromettere la fertilità, in giovani donne con mosaicismo per sindrome di Turner e riserva ovarica ridotta ma ancora presente, pazienti con premutazione del gene FRAXA (gene responsabile della sindrome dell'X fragile) con riserva ovarica ridotta

Per sottoporsi alla procedura le pazienti devono

- a) avere una buona prognosi rispetto alla guarigione dalla malattia di base,
- b) non riportare danni irreversibili all'utero,

c) ricevere l'approvazione dei Curanti.

Tecnica per il prelievo di ovociti

Per poter congelare gli ovociti, occorre realizzare una procedura simile a quella dei cicli di fecondazione in vitro.

In primo luogo è necessaria l'induzione di una superovulazione mediante l'uso di farmaci comunemente utilizzati nei cicli di fecondazione in vitro; questi farmaci comportano la crescita contemporanea di più follicoli contenenti gli ovociti all'interno delle ovaie della paziente.

Nel caso di tumori estrogeno-responsivi vengono utilizzati farmaci che mantengano i livelli ematici di estrogeni più bassi durante la stimolazione.

La stimolazione ovarica dura all'incirca 10-15 giorni. Durante la stimolazione è necessario effettuare un monitoraggio ecografico e biochimico della crescita follicolare, pertanto le pazienti devono recarsi presso l'Ambulatorio per effettuare prelievi di sangue e controlli ultrasonografici a giorni alterni per circa 3-4 volte.

Quando i follicoli raggiungono una dimensione adeguata, gli ovociti da crioconservare possono essere facilmente ottenuti mediante una tecnica di prelievo chiamata "pick-up".

Questa consiste nell'inserimento ecoguidato di un ago attraverso la vagina fino a pungere le ovaie e aspirare gli ovociti, tale procedura viene eseguita in anestesia locale più un'eventuale sedazione se la paziente dovesse richiederla.

Il pick-up è una procedura di routine, che si effettua regolarmente in tutti i cicli di fecondazione in vitro.

La procedura viene effettuata in regime ambulatoriale e le pazienti possono essere dimesse circa due ore dopo l'intervento.

Al termine del prelievo ovocitario sarà necessario firmare il Consenso Informato alla crioconservazione degli ovociti recuperati; una copia di questo consenso verrà consegnata alla paziente mentre l'altra costituirà parte integrante della scheda di congelamento degli ovociti della paziente, archiviata presso il Laboratorio FIVER.

Crioconservazione di ovociti

Gli ovociti prelevati durante il "pick-up" vengono immediatamente posti in un terreno di coltura e crioconservati in azoto liquido entro due 2 ore.

Prima di procedere alla crioconservazione è necessario stabilire il grado di maturazione degli ovociti mediante dissezione enzimatica e meccanica per separare le cellule della granulosa (cellule che avvolgono l'ovocita) dall'ovocita.

Una volta “denudato” l'ovocita è possibile stabilirne il grado di maturazione:

- **Ovocita Immaturato:**

GV (Vescicola Germinale – stadio di Profase I)

M I (stadio di Metafase I)

- **Ovocita Maturo:** M II (stadio di Metafase II)

Gli ovociti in Metafase II sono ovociti in stadio maturativo idoneo alla fecondazione in vitro mentre quelli immaturi richiedono un processo di maturazione in vitro (IVM – In Vitro Maturation) prima di essere fecondati.

Presso il nostro Centro vengono crioconservati solamente gli ovociti maturi allo stadio MII.

Gli ovociti MII così ottenuti vengono crioconservati mediante la tecnica di **Vitrificazione** che prevede una breve esposizione degli ovociti a temperature critiche con un'elevata concentrazione di crioprotettori. In seguito gli ovociti vengono caricati in appositi dispositivi di congelamento (precedentemente identificati in maniera indelebile con i dati della paziente) e immersi direttamente in azoto liquido a -196° C.

Durante il processo di vitrificazione gli ovociti e il terreno di congelamento che li circonda solidificano in una struttura amorfa simile al vetro (da cui deriva il nome della tecnica) evitando così la formazione di cristalli di ghiaccio.

Al termine del congelamento gli ovociti vengono stoccati in contenitori dedicati presenti presso la sala criobiologia del Laboratorio FIVER e tutti i dati relativi alla paziente e al congelamento vengono archiviati in apposite schede di laboratorio.

Una volta completato il processo di congelamento la paziente riceverà all'indirizzo indicato nel consenso informato una relazione di laboratorio in cui verranno date tutte le informazioni relative agli ovociti crioconservati.

· La Vitrificazione, metodica attualmente in uso nel nostro laboratorio è, ad oggi, la tecnica di elezione per la crioconservazione di ovociti e presenta percentuali di sopravvivenza superiori al 90%. Dai dati in letteratura emerge che la vitrificazione è in grado di preservare la qualità ovocitaria mantenendo un profilo metabolico paragonabile a quello degli ovociti freschi.

· In seguito ai dati incoraggianti ottenuti grazie alla vitrificazione, la Società Americana di Medicina della Riproduzione (ASRM) durante il Congresso annuale del 2012 ha dichiarato che la

Vitrificazione degli ovociti non deve più essere considerata una tecnica sperimentale bensì una tecnica consolidata.

· La durata, in termini di anni, del materiale crioconservato al momento non è disponibile ma potenzialmente gli ovociti possono sopravvivere in azoto liquido per un tempo indefinito.

I suddetti protocolli di laboratorio potranno subire delle modifiche in relazione ai dati emergenti dalla letteratura e all'esperienza maturata direttamente dal nostro laboratorio.

Impiego degli ovociti crioconservati

Nel momento in cui una paziente, dopo la guarigione della sua malattia primaria, esprime il desiderio di utilizzare il materiale crioconservato, si può procedere con lo scongelamento degli ovociti. In caso si tratti di una paziente con pregressa patologia oncologica è necessario ottenere il consenso dei medici oncologi, che attestano la remissione completa della malattia ed è solitamente necessario attendere un intervallo di tempo, concordato con i Curanti, dopo il termine delle terapie antitumorali.

La paziente, scongelando gli ovociti, entra automaticamente in un programma di fecondazione in vitro volto ad ottenere una **gravidanza nell'ambito di una coppia in continuità di rapporto.**

I dispositivi di congelamento, contenenti gli ovociti, vengono inizialmente sottoposti ad uno sbalzo termico passando da -196°C a $+37^{\circ}\text{C}$ e in seguito scongelati mediante passaggi successivi in soluzioni contenenti concentrazioni decrescenti di crioprotettori.

Terminato lo scongelamento gli ovociti vengono osservati al microscopio per valutarne l'integrità strutturale ed in seguito messi in appositi terreni di coltura e incubati per almeno un'ora prima della fecondazione in vitro.

Contestualmente allo scongelamento ovocitario il partner maschile dovrà produrre un campione di liquido seminale necessario per la successiva fecondazione in vitro.

Gli ovociti vengono quindi inseminati mediante la tecnica **ICSI** (IntraCytoplasmic Sperm Injection) che prevede la microiniezione di un singolo spermatozoo nel citoplasma ovocitario. Dopo 16-18 h dalla microiniezione viene valutata la fecondazione degli ovociti e si procede con la coltura in vitro fino all'ottenimento degli embrioni da trasferire in utero.

Il trasferimento di embrioni ottenuti da ovociti crioconservati può avvenire durante un ciclo spontaneo della paziente oppure, in caso di pazienti in menopausa precoce o di crescita endometriale inadeguata, durante un ciclo stimolato con estrogeni o gonadotropine.

N.B. Il congelamento degli ovociti se da una parte permette di preservarne la competenza, dall'altra comporta alcune variazioni strutturali tra le quali la più importante è rappresentata dalla prematura estrusione dei granuli corticali con conseguente indurimento della zona pellucida.

Proprio a causa di questo indurimento al momento dello scongelamento non è possibile effettuare una fecondazione in vitro mediante la tecnica classica (FIVET) ma è necessario effettuare una ICSI.

I suddetti protocolli di laboratorio potranno subire delle modifiche in relazione ai dati emergenti dalla letteratura e all'esperienza maturata direttamente dal nostro laboratorio.

PRESUPPOSTI AFFINCHE' POSSANO AVVENIRE LO SCONGELAMENTO DEGLI OVOCITI, LA FERTILIZZAZIONE E IL TRASFERIMENTO IN UTERO DEGLI EMBRIONI

- remissione completa della malattia e consenso dei Curanti
- età < 50 anni
- sopravvivenza degli ovociti allo scongelamento
- fertilizzazione degli ovociti e corretto clivaggio degli embrioni
- idoneità endometriale

Risultati

Nel 1986 Chen e colleghi hanno descritto la prima nascita da ovociti crioconservati mediante la tecnica del congelamento lento, mentre la prima nascita da ovociti vitrificati è stata riportata nel 1999 da Kuleshova e colleghi.

La crioconservazione degli ovociti ha mostrato ottimi risultati in termini di sopravvivenza, fertilizzazione, clivaggio e gravidanza. Tuttavia, i tassi di gravidanza per cicli di scongelamento variano considerevolmente a seconda della popolazione di pazienti, delle condizioni cliniche, della qualità degli ovociti e del numero di embrioni trasferiti oltre che alla tecnica di crioconservazione in sé.

Il successo della crioconservazione ovocitaria è decisamente migliorato nell'ultima decade e i dati sono rassicuranti, pertanto questa tecnica non è più considerata come sperimentale. Inoltre, sebbene i dati siano ancora limitati non sono state riscontrate differenze significative nei bambini nati da ovociti freschi e da ovociti congelati con tecniche di fecondazione in vitro né in termini di aumento delle aneuploidie cromosomiche, difetti di nascita, nè deficit dello sviluppo.

Il programma FERTISAVE per la preservazione della fertilità femminile è attivo presso il nostro Centro di Fisiopatologia della Riproduzione dell'Ospedale Sant'Anna di Torino dal 2000; a tutto il 2019 sono 607 i casi di donne e bambine sottoposte da noi a criopreservazione della fertilità: 369 mediante crioconservazione di ovociti, 238 mediante crioconservazione di corticale ovarica.

Bibliografia

1. Chen C. *Pregnancy after human oocyte cryopreservation*. Lancet, i:884-6, 1986
2. Chian RC, Huang JY, Tan SL, Lucena E, Saa A, Rojas A, et al. Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;16:608–10. Level II-3.
3. Cobo A., Rubio C., Gerli S., Ruiz A., Pellicer A., Remohi J., Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes, *Fertil Steril*, Volume: 75, 2001, pp. 354—360
4. Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008;89:1657–64. Level I.
5. Cobo, A., and Diaz, C. “Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trial”. 2011 *Fertil Steril* , 96.
6. Cobo, A., and Diaz, C. “Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trial”. 2011 *Fertil Steril* , 96
7. Hong SW et al. *Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods*. *Fertil Steril*, 72: 142-6, 1999
8. Kazem R et al. *Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. *Hum Reprod*, 10:2650-4, 1995
9. Kuleshova L., Gianaroli L., Magli C., Ferraretti A., Trounson A., Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report, *Hum Reprod*, Volume: 14, (1999), pp. 3077—3079
10. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 2006;24:2917–31. Level III.
11. Leibo, S. P., and Pool, T. B. (2011). The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. *Fertil Steril* , 96(2): 269-76.

12. Nagy, Z. P. (2009). The efficacy and safety of human oocyte vitrification. *Semin Reprod Med* , 27(6): 450-5.
13. Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod Biomed Online* 2009;18:769–76. Level II-3
14. Parmegiani L et al. Long term cryostorage does not adversely affect the outcome of oocyte thawing cycles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 Sept; 19(3):374-9
15. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, et al. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011;23:505–12. Level I.
16. Peccatori FA, Pup LD, Salvagno F, Guido M, Sarno MA, Revelli A, Piano LD, Dolfi E, Franchi D, Molinari E, Immediata V, Chiavari L, Vucetich A, Borini A. Fertility Preservation Methods in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 2012 Jun;7(3):197-202. Epub 2012 Jun 27.
17. Porcu E et al. *Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes*. *Fertil Steril*, 4:724-6, 1997
18. Revelli A et al. Oocyte cryostorage to preserve fertility in oncological patients. *Obstet Gynecol Int*.2012;2012:525896 Epub 2012 Jan 15.
19. Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, et al. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2010; 25:66–73. Level I.
20. Rienzi L, Cobo A, Paffoni A, Scarduelli C, Capalbo A, Vajta G, et al. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum Reprod* 2012;27:1606–12. Level II-2.
21. Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slowrate freezing or vitrification. *Fertil Steril* 2010;94:2088–95. Level I.
22. Von Wolff, M. (2009). Ovarian stimulation to cryopreserve fertilized oocytes in cancer patients can be started in the luteal phase. *Fertil Steril* , 92(4): 1360-5.
23. Yoon, T., Chung, H., Lim, J., Han, S., Ko, J., and Cha, K. (2000). Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* , 74: 180–181
24. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology, Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril*. 2013 Jan;99:37-43.