



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



ALLEGATO 3

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.

Protocollo sperimentale: crioconservazione e trapianto di frammenti ovarici per la preservazione della fertilità femminile in pazienti a rischio di esaurimento ovarico precoce.

Il protocollo qui illustrato prevede che, nel caso di pazienti selezionate, si proceda a congelare e conservare per lungo tempo frammenti di ovaio.

La crioconservazione di tessuto ovarico è una tecnica di preservazione della fertilità femminile per tutte le pazienti a rischio di insufficienza ovarica precoce tuttora considerata sperimentale che sta conducendo a risultati assai promettenti.

Ad oggi più di 130 bambini sono nati da trapianto di tessuto ovarico crioconservato in Spagna, Belgio, Danimarca, Francia, Italia, Germania, Israele, Sud Africa, Norvegia e Australia.

L'induzione della pubertà grazie a trapianto di tessuto prelevato e congelato in pazienti prepuberi è stata dimostrata da Poirot e da Ernst e recentemente il gruppo belga di Isabelle Demeestere ha descritto la prima gravidanza ottenuta grazie a un tessuto congelato prima della pubertà.

Pazienti candidate alla preservazione della fertilità mediante crioconservazione di tessuto ovarico

Le condizioni cliniche nelle quali si può applicare la crioconservazione dei frammenti ovarici sono le seguenti:

- a) bambine e giovani donne di età inferiore a 38 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 di età inferiore a 38 anni 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, nei rari casi in cui non sia possibile procedere a stimolazione ovarica e crioconservazione di ovociti;
- c) donne di età inferiore a 38 anni 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 nei casi in cui la chirurgia conservativa non sia praticabile;
- 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

Per sottoporsi alla procedura le pazienti devono

- a) avere una buona prognosi rispetto alla guarigione dalla malattia di base,
- a) non riportare danni irreversibili all'utero,
- b) ricevere l'approvazione dei Curanti.

Tecnica per il prelievo di frammenti ovarici umani.

I **frammenti ovarici** si possono prelevare agevolmente durante un intervento laparoscopico, in anestesia generale.

Nulla vieta, naturalmente, di effettuare il prelievo nel corso di un intervento di chirurgia tradizionale, ad addome aperto.

La biopsia laparoscopica di corticale ovarica può essere programmata in qualsiasi fase del ciclo mestruale ed è organizzabile in pochi giorni.

La procedura di prelievo dei frammenti ovarici può essere effettuata nell'ambito della SCU Ginecologia e Ostetricia 1 dell'Ospedale Sant'Anna o presso il reparto di Chirurgia Pediatrica dell'Ospedale Infantile Regina Margherita.

Tuttavia poiché diversi autori hanno evidenziato che la corticale ovarica può resistere durante il trasporto in ghiaccio per un periodo piuttosto lungo, fino a 20 ore, senza danni significativi è possibile procedere al congelamento di tessuto prelevato anche in altri ospedali.

Crioconservazione di frammenti di corticale ovarica.

Congelamento

La biopsia di corticale ovarica della paziente viene immediatamente posizionata in un terreno di coltura tamponato e trasportata, in ghiaccio non secco, dalla sala operatoria al laboratorio FIVER del nostro centro. Qualora il prelievo venisse eseguito da entrambe le ovaie è preferibile tenere separate le biopsie per tutto il processo di congelamento.

In seguito si procede alla dissezione meccanica del tessuto che ha lo scopo di isolare la corticale ovarica (in cui sono presenti i follicoli) dalla midollare. Una volta isolata la corticale ovarica si procede al sezionamento in frammenti di piccole dimensioni in modo da favorire la penetrazione dei crioprotettori e preservare in tal modo l'integrità strutturale e funzionale del tessuto durante il processo di congelamento.

Al momento del congelamento uno o due frammenti di ovaio vengono inviati all'Anatomia Patologica per la valutazione della conta follicolare (follicoli/mm²).

Il congelamento può avvenire mediante congelamento lento, tecnica sino ad ora utilizzata nella maggior parte dei centri, grazie alla quale sono nati finora la maggior parte dei bambini, oppure mediante vitrificazione, tecnica che potrebbe associarsi ad un miglior mantenimento delle strutture follicolari e stromali e ad aumentati tassi di sopravvivenza, sebbene siano necessari ulteriori studi.

Prima del congelamento è possibile, in casi selezionati, procedere al recupero di ovociti maturi o immaturi dai follicoli ovarici. Tali ovociti possono essere congelati separatamente dal tessuto ovarico e utilizzati dalla paziente per una ricerca di gravidanza.

Nel nostro Centro i frammenti ovarici vengono sottoposti a **congelamento lento** (slow freezing) mediante graduale esposizione a concentrazioni crescenti di crioprotettori, stoccati in appositi

dispositivi di congelamento (precedentemente identificati in maniera indelebile con i dati della paziente) e posti in un congelatore programmabile che abbassa progressivamente la temperatura da +20°C a -150°C.

Raggiunta la temperatura di -150°C i frammenti di tessuto ovarico vengono immersi in azoto liquido alla temperatura di -196°C e stoccati in contenitori dedicati presenti presso la sala criobiologica del Laboratorio FIVER. Al termine del congelamento tutti i dati relativi alla paziente vengono archiviati in apposite schede di laboratorio.

Una volta completato il processo di congelamento la paziente riceverà all'indirizzo indicato nel consenso informato:

- 1. una relazione di laboratorio in cui verranno date tutte le informazioni relative al tessuto crioconservato.**
- 2. una copia del referto dell'esame istologico.**

In relazione al referto istologico è importante sottolineare che la distribuzione dei follicoli nella corticale ovarica è disomogenea quindi il riscontro istologico non sempre è indice dell'effettiva quantità di follicoli contenuti nel tessuto crioconservato. Non si esclude pertanto la necessità di dover procedere a scongelamenti progressivi di frammenti di corticale per ottenere le informazioni necessarie relative alla qualità del campione crioconservato. In caso di mancato riscontro di follicoli ovarici nei campioni di corticale analizzati non sarà possibile garantire il reimpianto e il materiale verrà smaltito previa comunicazione alla paziente da parte del personale medico del centro.

N.B.

- Il congelamento lento, metodica attualmente in uso nel nostro laboratorio è, ad oggi, la tecnica di elezione per la crioconservazione di tessuto ovarico ed è in grado di garantire una sopravvivenza follicolare media del 70-80%. In letteratura è descritta anche una tecnica di congelamento alternativa, la vitrificazione: si tratta di una metodica di recente impiego nell'ambito della crioconservazione di tessuto ovarico che necessita di ulteriori studi clinici che ne dimostrino l'efficacia e la sicurezza.

- La conservazione, in termini di anni, del materiale ovarico crioconservato al momento non è quantificabile. La procedura in questione è infatti relativamente nuova e sono ancora pochi i casi di ritrapianto in tutto il mondo. In base ai dati della letteratura è possibile affermare che il tessuto

resista anche 10 anni o più dal congelamento, ma potenzialmente può 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.

Possibili impieghi del tessuto crioconservato

Nel momento in cui una paziente, dopo la guarigione della sua malattia primaria, esprima il desiderio di gravidanza si può procedere al ritrapianto del tessuto ovarico crioconservato al fine di ripristinare la fertilità.

In caso si tratti di una paziente con pregressa patologia oncologica è necessario un attento counselling multidisciplinare per valutare la possibilità di procedere al trapianto, la sicurezza di una gravidanza e la tempistica migliore per la paziente.

Prima del ritrapianto un frammento di tessuto ovarico crioconservato viene scongelato e inviato a un anatomo patologo per l'esame istologico per la valutazione istologica della morfologia, del numero di follicoli e per la ricerca della presenza di eventuali cellule neoplastiche.

Quest'ultima può essere valutata anche mediante PCR, quando siano disponibili marcatori molecolari della patologia neoplastica, mediante colorazione immunoistochimica o xenotrapianto.

Al momento del ritrapianto il tessuto viene scongelato, i cryovial vengono prima esposti a temperatura ambiente e poi immersi in bagni alla temperatura di 30°C. In seguito i frammenti ovarici vengono scongelati attraverso una serie di passaggi in soluzioni di scongelamento contenenti concentrazioni decrescenti di crioprotettori. Al termine dello scongelamento i frammenti vengono spostati in una piastra di Petri contenente un terreno tamponato e trasportati a temperatura ambiente in sala operatoria per il ritrapianto.

Il tessuto ovarico scongelato può essere ritrapiantato ortotopicamente, a livello della pelvi, oppure eterotopicamente, al di fuori della pelvi.

Poiché le pazienti sottoposte a trapianto si trovano in una condizione menopausale di ipogonadismo ipergonadotropo, una settimana prima dell'intervento si somministra alla paziente un farmaco analogo del GnRH per sopprimere la funzione ipofisaria ed abbassare in tal modo i livelli di gonadotropine circolanti; un eccesso di FSH potrebbe infatti danneggiare il tessuto appena ritrapiantato.

N.B.

- In caso di presenza di cellule neoplastiche nel tessuto crioconservato o in assenza di follicoli normalmente conservati NON sarà possibile procedere al ritrapianto del tessuto.

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

I frammenti ovarici potranno essere utilizzati come segue:

- Impieghi attuali:

A. Reimpianto di tessuto

- Possibili impieghi futuri:

B. Trapianto di follicoli isolati

C. Maturazione in vitro dei follicoli ovarici (IVM)

A. Reimpianto

Il tessuto, una volta scongelato può essere ritrapiantato ortotopicamente a livello dell'ovaio residuo o comunque della pelvi, oppure eterotopicamente a livello di altri siti particolarmente vascolarizzati. Attualmente le gravidanze riportate in letteratura sono state ottenute mediante **ritrapianto ortotopico**, pertanto questa è al momento attuale la **tecnica di riferimento nel nostro Centro**.

Il reimpianto dei frammenti ovarici scongelati potrà essere effettuato mediante una laparoscopia, una laparotomia o una combinazione delle due tecniche.

Attualmente i trapianti effettuati nel nostro Centro sono stati eseguiti in laparoscopia.

Secondo quanto descritto da Donnez e colleghi il ritrapianto ortotopico può avvenire a livello dell'ovaio residuo, quando questo sia presente, oppure a livello della fossetta ovarica, nel peritoneo adiacente l'ovaio stesso. Le due procedure possono essere associate tra loro.

Il ritrapianto può avvenire in un unico intervento o in due tempi secondo la 'two step laparoscopy' descritta da Donnez che ha proposto un primo intervento volto a preparare i siti destinati a ricevere i frammenti ovarici scongelati (ovaio residuo e/o peritoneo) per favorire la vascolarizzazione e un secondo intervento in cui avviene il vero e proprio ritrapianto.

PRESUPPOSTI AFFINCHE' POSSA AVVENIRE IL RITRAPIANTO DI TESSUTO OVARICO CRIOCONSERVATO:

- remissione completa della malattia e consenso dei Curanti
- età premenopausale
- presenza di follicoli nel tessuto crioconservato
- assenza di contaminazione da parte di cellule neoplastiche nel tessuto conservato

Il protocollo proposto si prefigge lo scopo di identificare le modalita' tecniche ottimali per il reimpianto ortotopico o eterotopico. Non si esclude la possibilita' di ottenere gravidanze da ovociti derivanti da frammenti ovarici crioconservati e reimpiantati purché si tratti di gravidanze omologhe nell'ambito di coppie in continuita' di rapporto.

Si esclude invece la possibilita' di reimpiantare frammenti ovarici di una paziente in un'altra paziente o di effettuare il reimpianto nei casi in cui esista il rischio che vi siano metastasi ovariche di una neoplasia maligna, che potrebbero provocare una ripresa della malattia in seguito al reimpianto.

B. Trapianto di follicoli isolati

C. Maturazione in vitro dei follicoli ovarici (IVM)

La principale limitazione al reimpianto di frammenti di tessuto ovarico nelle pazienti oncologiche è rappresentata dalla possibilità di reintrodurre cellule tumorali durante il trapianto del materiale crioconservato. Per ovviare a tale rischio si stanno studiando tecniche sperimentali di utilizzo del tessuto ovarico come ad esempio l'isolamento e il reimpianto di follicoli isolati e la maturazione follicolare in vitro.

L'isolamento dei singoli follicoli dai frammenti di tessuto ovarico è una tecnica innovativa che permette di eliminare le cellule neoplastiche potenzialmente presenti, preservando solamente le cellule germinali (è da sottolineare come le cellule neoplastiche non superino la membrana basale dei follicoli ovarici). L'isolamento di questi follicoli può essere effettuato sia su tessuto a fresco, con conseguente crioconservazione dei singoli follicoli, sia su tessuto scongelato con conseguente reimpianto dei singoli follicoli o coltura in vitro degli stessi.

La maturazione in vitro di follicoli primordiali e primari contenuti nel tessuto crioconservato è un'altra opzione innovativa che ha lo scopo di indurre la follicologenesi in vitro per ottenere ovociti in stadio maturativo idoneo per l'impiego nelle tecniche di Fecondazione in Vitro (IVF). Alcuni studi hanno già dimostrato nel modello animale la possibilità che il complesso ovocita-cellule della

granulosa derivanti da tessuto ovarico crioconservato sia in grado di crescere e raggiungere le caratteristiche di follicolo antrale e dare origine ad ovociti fecondabili.

Nella specie umana non si è ancora raggiunta la maturazione di un ovocita partendo dai follicoli contenuti nella corticale ovarica e gli studi sono ancora allo stadio iniziale di comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nel processo di maturazione e delle migliori modalità di coltura da impiegare.

Ad oggi nel nostro Centro non si applicano tali tecniche di utilizzo del tessuto ovarico crioconservato.

Risultati

Il vantaggio principale della crioconservazione di tessuto ovarico e' rappresentato dal gran numero di follicoli primordiali e primari che vengono conservati e dalla loro relativa resistenza ai danni da congelamento, con una sopravvivenza stimata del 70-80% dopo lo scongelamento.

La crioconservazione di tessuto ovarico, inoltre, non richiede alcuna preparazione specifica, per cui l'inizio delle terapie per la malattia primaria non deve essere posticipato se non di pochissimi giorni; questa caratteristica e' importante per le pazienti oncologiche candidate a trattamenti che non possano essere rimandati.

La ripresa della funzione endocrina in seguito al trapianto ovarico, con la relativa risoluzione della sintomatologia menopausale presentata da alcune pazienti, rappresenta un altro vantaggio della crioconservazione di tessuto ovarico. Questa tecnica e' infine l'unica opzione per preservare la fertilità in pazienti prepuberi.

La ripresa della funzione ovarica è stata descritta da tutti gli autori che hanno riportato casi di trapianto di tessuto ovarico crioconservato, dopo circa 3-4 mesi, in accordo con i tempi della follicologenesi.

Ad oggi più di 130 bambini sono nati da trapianto di tessuto ovarico in Spagna, Belgio, Danimarca, Francia, Italia, Germania, Israele, Sud Africa, Norvegia e Australia.

L'analisi dell'efficienza della tecnica è complessa per la mancanza di un denominatore certo rappresentato dal numero di trapianti effettuati nel mondo.

Il gruppo di Donnez ha riportato una pregnancy rate per trapianto del 29% in una serie di 111 trapianti; in questo gruppo 2 donne hanno partorito 3 figli ciascuna dimostrando la possibilità di concepire più volte dopo 1 solo trapianto.

Silber ha riportato una pregnancy rate per trapianto del 25-30%, mentre il gruppo tedesco del FertiPROTEKT indica una live birth rate/paziente del 31%.

Quasi tutti i bambini sono nati da tessuto congelato con la tecnica del congelamento lento, tranne quelli del gruppo giapponese.

Tutti i bambini sono nati in seguito a trapianto ortotopico tranne la gravidanza gemellare descritta da Stern.

Attualmente è difficile definire quale sia la tecnica chirurgica migliore in termini di risultati e quale sito di impianto dovrebbe essere preferito.

Più del 50% delle pazienti ha concepito spontaneamente, il che rappresenta un'ottima motivazione in favore del trapianto ortotopico.

Gli esiti della gravidanza si sono dimostrati simili a quelli della popolazione generale e tutti i bambini nati sono in buona salute.

L'induzione della pubertà grazie a trapianto di tessuto prelevato e congelato in pazienti prepuberi è stata dimostrata da Poirot e da Ernst e recentemente il gruppo belga di Isabelle Demeestere ha descritto la prima gravidanza ottenuta grazie a un tessuto congelato prima della pubertà.

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.

CRIOCONSERVAZIONE di TESSUTO OVARICO

PRIMA VISITA AMBULATORIO FERTISAVE

- Colloquio con il medico
- Lettura dell'informativa e firma del consenso informato al trattamento
- Lettura e firma del consenso per la crioconservazione del tessuto ovarico (da riconfermare ogni anno)
- Possibilità di consulenza psicologica

PRELIEVO del TESSUTO OVARICO

- Prelievo del tessuto ovarico per via laparoscopica (LPS) o durante intervento laparotomico per altra indicazione
- La tecnica prevede il prelievo di una parte della corticale ovarica, al cui interno si trovano i follicoli ovarici

CRIOCONSERVAZIONE del TESSUTO OVARICO

- Preparazione del tessuto per la crioconservazione: dissezione della corticale ovarica dalla midollare e sezione in frammenti della corticale ovarica
- Invio di alcuni frammenti di corticale ovarica in anatomia patologica per esame istologico con valutazione della conta follicolare
- Crioconservazione del tessuto ovarico
- Invio alla paziente della relazione di laboratorio e del referto istologico

COSA FARE DOPO LA CRIOCONSERVAZIONE

Una volta all'anno è richiesto al paziente di:

- Rinnovare la firma del consenso per la crioconservazione del tessuto ovarico c/o il laboratorio FIVER (previo accordo telefonico con il laboratorio FIVER; TEL: 011.3134228)
- Bonifico bancario di 60 € per mantenere la crioconservazione del tessuto ovarico c/o il laboratorio FIVER

RITRAPIANTO di TESSUTO OVARICO CRIOCONSERVATO

PRESUPPOSTI NECESSARI

- **Remissione completa** della malattia e **consenso dei Curanti**
- Nel caso di pazienti oncologiche si attende solitamente **un intervallo di tempo**, in accordo con i Curanti, **dopo il termine delle terapie antitumorali**
- **Età premenopausale**
- **Presenza di follicoli** nel tessuto crioconservato
- **Assenza di contaminazione da parte di cellule neoplastiche** nel tessuto crioconservato

UTILIZZO dei FRAMMENTI OVARICI: il REIMPIANTO

- Il tessuto può essere ritrapiantato **ortotopicamente** a livello dell'ovaio residuo (tecnica attualmente utilizzata nel nostro Centro) oppure **eterotopicamente** a livello di altri siti particolarmente vascolarizzati
- Il reimpianto dei frammenti ovarici scongelati potrà essere effettuato mediante **una laparoscopia, una laparotomia o una combinazione delle due tecniche** (attualmente i trapianti effettuati nel nostro Centro sono effettuati in laparoscopia)

Bibliografia

1. Stern CJ, Gook D, Hale LG, Agresta F, Oldham J, Rozen G, et al. First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy. *Hum Reprod* 2013 Nov;28(11):2996-9.
2. Donnez J, Dolmans MM. Transplantation of ovarian tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2014 Nov;28(8):1188-97.
3. Akar ME, Carrillo AJ, Jennell JL, Yalcinkaya TM. Robotic-assisted laparoscopic ovarian tissue transplantation. *Fertil Steril* 2011 Mar 1;95(3):1120 e5-8.
4. Oktay K, Economos K, Kan M, Rucinski J, Veeck L, Rosenwaks Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA* 2001 Sep 26;286(12):1490-3.
5. Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, et al. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004 Mar;363(9412):837-40.
6. Oktay K. Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection? *Hum Reprod* 2006 Jun;21(6):1345-8.
7. Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Lailla JM, Balasch J. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Sep;86(9):4489-94.
8. Kim SS, Hwang IT, Lee HC. Heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue as a strategy to restore ovarian function. *Fertil Steril* 2004 Oct;82(4):930-2.
9. Kim SS, Lee WS, Chung MK, Lee HC, Lee HH, Hill D. Long-term ovarian function and fertility after heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue: 8-year experience in cancer patients. *Fertil Steril* 2009 Jun;91(6):2349-54.
10. Rosendahl M, Loft A, Byskov AG, Ziebe S, Schmidt KT, Andersen AN, et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue: case report. *Hum Reprod* 2006 Aug;21(8):2006-9.
11. Oktay K, Aydin BA, Karlikaya G. A technique for laparoscopic transplantation of frozen-banked ovarian tissue. *Fertil Steril* 2001 Jun;75(6):1212-6.
12. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004 Oct 16-22;364(9443):1405-10.
13. Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Meister H, Ceschin AP, Kriger E, Ferreira JO. Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy. *Fertil Steril* 2004 Jan;81(1):160-4.

14. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report. *Hum Reprod* 2006 Jan;21(1):183-8.
15. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist* 2007 Dec;12(12):1437-42.
16. Roux C, Amiot C, Agnani G, Aubard Y, Rohrlich PS, Piver P. Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Fertil Steril* 2010 May 1;93(7):2413 e15-9.
17. Revel A, Laufer N, Ben Meir A, Lebovich M, Mitrani E. Micro-organ ovarian transplantation enables pregnancy: a case report. *Hum Reprod* 2011 May;26(5):1097-103.
18. Oktay K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. *Hum Reprod Update* 2001 Nov-Dec;7(6):526-34.
19. Dittrich R, Lotz L, Keck G, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, et al. Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. *Fertil Steril* 2012 Feb;97(2):387-90.
20. Callejo J, Salvador C, Gonzalez-Nunez S, Almeida L, Rodriguez L, Marques L, et al. Live birth in a woman without ovaries after autograft of frozen-thawed ovarian tissue combined with growth factors. *J Ovarian Res* 2013;6(1):33.
21. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 Oct 22;110(43):17474-9.
22. Sanchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escriba MJ, Simon C, et al. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril* 2010 Jan;93(1):268 e11-3.
23. Tanbo T, Greggains G, Storeng R, Busund B, Langebrekke A, Fedorcsak P. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue after treatment for malignant disease - the first Norwegian results. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015 Sep;94(9):937-41.
24. Burmeister L, Kovacs GT, Osianlis T. First Australian pregnancy after ovarian tissue cryopreservation and subsequent autotransplantation. *Med J Aust* 2013 Feb 18;198(3):158-9.

25. Meirov D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005 Jul 21;353(3):318-21.
26. Silber SJ. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Mol Hum Reprod* 2012 Feb;18(2):59-67.
27. Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG, Loft A, Ottosen C, Dueholm M, et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod* 2008 Oct;23(10):2266-72.
28. Rodriguez-Wallberg KA, Karlstrom PO, Rezapour M, Castellanos E, Hreinsson J, Rasmussen C, et al. Full-term newborn after repeated ovarian tissue transplants in a patient treated for Ewing sarcoma by sterilizing pelvic irradiation and chemotherapy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015 Mar;94(3):324-8.
29. Revelli A, Marchino G, Dolfin E, Molinari E, Delle Piane L, Salvagno F, et al. Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy. *Fertil Steril* 2013 Jan;99(1):227-30.
30. Meirov D, Roness H, Kristensen SG, Andersen CY. Optimizing outcomes from ovarian tissue cryopreservation and transplantation; activation versus preservation. *Hum Reprod* 2015 Nov;30(11):2453-6.
31. Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P, Andersen CY. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet* 2017 Mar;34(3):325-36.
32. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet* 2015 Aug;32(8):1167-70.
33. Meirov D, Ra'anani H, Shapira M, Brenghausen M, Derech Chaim S, Aviel-Ronen S, et al. Transplantations of frozen-thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria. *Fertil Steril* 2016 08;106(2):467-74.
34. Donnez J, Dolmans MM, Diaz C, Pellicer A. Ovarian cortex transplantation: time to move on from experimental studies to open clinical application. *Fertil Steril* 2015 Nov;104(5):1097-8.
35. Silber S. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications. *J Assist Reprod Genet* 2016 Dec;33(12):1595-603.

36. Van der Ven H, Liebenthron J, Beckmann M, Toth B, Korell M, Krüssel J, et al. Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates. *Hum Reprod* 2016 09;31(9):2031-41.
37. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod* 2015 Mar;30(3):608-15.
38. Poirot CJ, Martelli H, Genestie C, Golmard JL, Valteau-Couanet D, Helardot P, et al. Feasibility of ovarian tissue cryopreservation for prepubertal females with cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2007 Jul;49(1):74-8.
39. Ernst E, Kjærsgaard M, Birkebæk NH, Clausen N, Andersen CY. Case report: stimulation of puberty in a girl with chemo- and radiation therapy induced ovarian failure by transplantation of a small part of her frozen/thawed ovarian tissue. *Eur J Cancer* 2013 Mar;49(4):911-4.
40. Demeestere I, Simon P, Dedeken L, Moffa F, Tsépélidis S, Brachet C, et al. Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood. *Hum Reprod* 2015 Sep;30(9):2107-9.
41. Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil Steril* 2013 May;99(6):1514-22.
42. McLaughlin M, Albertini DF, Wallace WHB, Anderson RA, Telfer EE. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Mol Hum Reprod* 2018 Mar;24(3):135-42.
43. Amorim CA, Shikanov A. The artificial ovary: current status and future perspectives. *Future Oncol* 2016 Oct;12(20):2323-32.
44. Soares M, Sahrari K, Amorim CA, Saussoy P, Donnez J, Dolmans MM. Evaluation of a human ovarian follicle isolation technique to obtain disease-free follicle suspensions before safely grafting to cancer patients. *Fertil Steril* 2015 Sep;104(3):672-80 e2.
45. Dittrich R, Lotz L, Fehm T, Krüssel J, von Wolff M, Toth B, et al. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue--a systematic review of MII oocyte maturation and discussion of it as a realistic option for restoring fertility after cancer treatment. *Fertil Steril* 2015 Jun;103(6):1557-65.