

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

DOTTORATO DI RICERCA IN  
Scienze Mediche e Chirurgiche

Progetto n. 1 "Metodologie di Ricerca nelle Malattie Vascolari"

*Ciclo XXV*

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/C1 - CHIRURGIA GENERALE**

**Settore Scientifico disciplinare: MED/18 - CHIRURGIA GENERALE**

*LA NEOANGIOGENESI NEL REIMPIANTO AUTOLOGO DI TESSUTO  
OVARICO IN PAZIENTI A RISCHIO DI FALLIMENTO OVARICO PRECOCE:  
OTTIMIZZAZIONE DEI METODI  
DI CRIOCONSERVAZIONE DI CORTICALE OVARICA*

*Presentata da: Magnani Valentina*

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof. Andrea Stella**

**Prof. Gianandrea Pasquinelli**

*Esame finale anno 2013*

## INDICE SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE</b>	5
<b>1.1 Gonadi femminili: le ovaie</b>	6
Oogenesi e Maturazione Follicolare	8
Anomalie della Funzione Ovarica e Mestruale	10
La menopausa	10
<b>1.2 Amenorrea, Menopausa precoce, Sterilità e terapia antineoplastica</b>	11
La radioterapia	12
La chemioterapia	14
Conseguenze cliniche	14
Danno morfologico ovarico	15
<b>1.3 Preservare la fertilità</b>	16
Crioconservazione di tessuto ovarico	16
A chi è rivolta la crioconservazione di tessuto ovarico	17
Crioconservazione	17
Tecniche di Crioconservazione	18
Congelamento lento-scongelamento rapido	18
Congelamento lento di fettine di corticale ovarica	20
Impieghi del tessuto ovarico umano crioconservato	23
Reimpianto orto topico	24
Reimpianto etero topico	30
Fattori limitanti lo sviluppo follicolare e la ripresa della funzionalità ovarica	32
Ruolo di fattori esogeni	33
Sicurezza del reimpianto di tessuto ovarico	34
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b>	36
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	37
<b>3.1 Pazienti incluse nello studio</b>	37
<b>3.2 Prelievo di tessuto ovarico</b>	37

<b>3.3 Protocollo di crioconservazione: congelamento lento/scongelo rapido</b>	39
<b>3.4 Analisi in microscopia</b>	41
Allestimento dei preparati	41
Protocollo di inclusione in resina epossidica	41
Protocollo d'inclusione in paraffina	43
Protocollo colorazione per la TUNEL assay	44
Protocollo colorazione per la microscopia laser scanning confocale	44
Colorazioni per l'individuazione dei mitocondri attivi e delle specie reattive dell'ossigeno	45
Parametri di valutazione	46
Analisi morfologica strutturale	46
Analisi dell'induzione dell'apoptosi	47
Analisi morfologica ultrastrutturale	47
Analisi confocale	48
Analisi statistica	50
<b>3.5 Analisi di laboratorio: dosaggi ormonali</b>	50
<b>3.6 Analisi strumentali: Ecografia bidimensionale e ColorDoppler</b>	51
<b>3.7 Storia clinica</b>	52
Paziente 1	52
Paziente 2	53
Paziente 3	54
<b>3.8 Procedura di reimpianto autologo di corticale ovarica</b>	54
Reimpianto ortotopico (Paziente 1 e 3)	54
Reimpianto eterotopico (Paziente 2)	56
Follow-up	56
<b>4. RISULTATI</b>	57
<b>4.1 Microscopia ottica</b>	57
<b>4.2 TUNEL assay</b>	58
<b>4.3 Microscopia elettronica</b>	59
<b>4.4 Microscopia Laser Scanning Confocale (CLSM)</b>	61

<b>4.5 Profili ormonali ed indagini ecografiche</b>	63
Paziente 1	63
Paziente 2	64
Paziente 3	65
<b>5. CONCLUSIONE E CONSIDERAZIONI PROSPETTICHE</b>	68
<b>7. FONTI E RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b>	73

## PREMESSA

L'aumento dell'aspettativa di vita delle pazienti grazie ai trattamenti antineoplastici può essere considerato un successo solo se la qualità di vita delle pazienti viene effettivamente rispettata.

L'aumento del tasso di sopravvivenza delle giovani pazienti oncologiche, ha messo in evidenza gli effetti collaterali a lungo termine dei trattamenti ai quali vengono sottoposte portando in primo piano il problema della funzionalità gonadica dopo la guarigione.

Chemioterapia e radioterapia possono compromettere o interrompere anticipatamente la funzionalità ovarica, aggravando così già i gravi disturbi fisici e psicologici che la paziente deve affrontare nel lungo percorso verso la guarigione.

Per migliorare la qualità di vita di queste pazienti è dunque necessario considerare strategie utili a favorire il mantenimento della funzione ovarica.

La crioconservazione di tessuto ovarico prima dell'inizio dei trattamenti antitumorali congiunta al reimpianto autologo si propone oggi come unica possibilità per le pazienti prepuberi, per le pazienti affette da tumori ormono-sensibili o per quelle pazienti che non possono ritardare in alcun modo l'inizio della terapia, per poter preservare la propria funzione ovarica. Anche se i risultati sono incoraggiati, infatti grazie a questa tecnica nel mondo sono nati 22 bambini, ancora molto si deve fare per poter offrire a queste pazienti un percorso e una tecnologia all'avanguardia.

In particolare uno il principale problema del trapianto è il danno ischemico che si crea nel tessuto trapiantato; il tempo di ri-perfusione risulta essere critico per la sopravvivenza dei follicoli. Si stima infatti che nell'uomo il danno ischemico provochi un drastico impoverimento del pool di follicoli presente nel tessuto trapiantato addirittura del 60-95%.

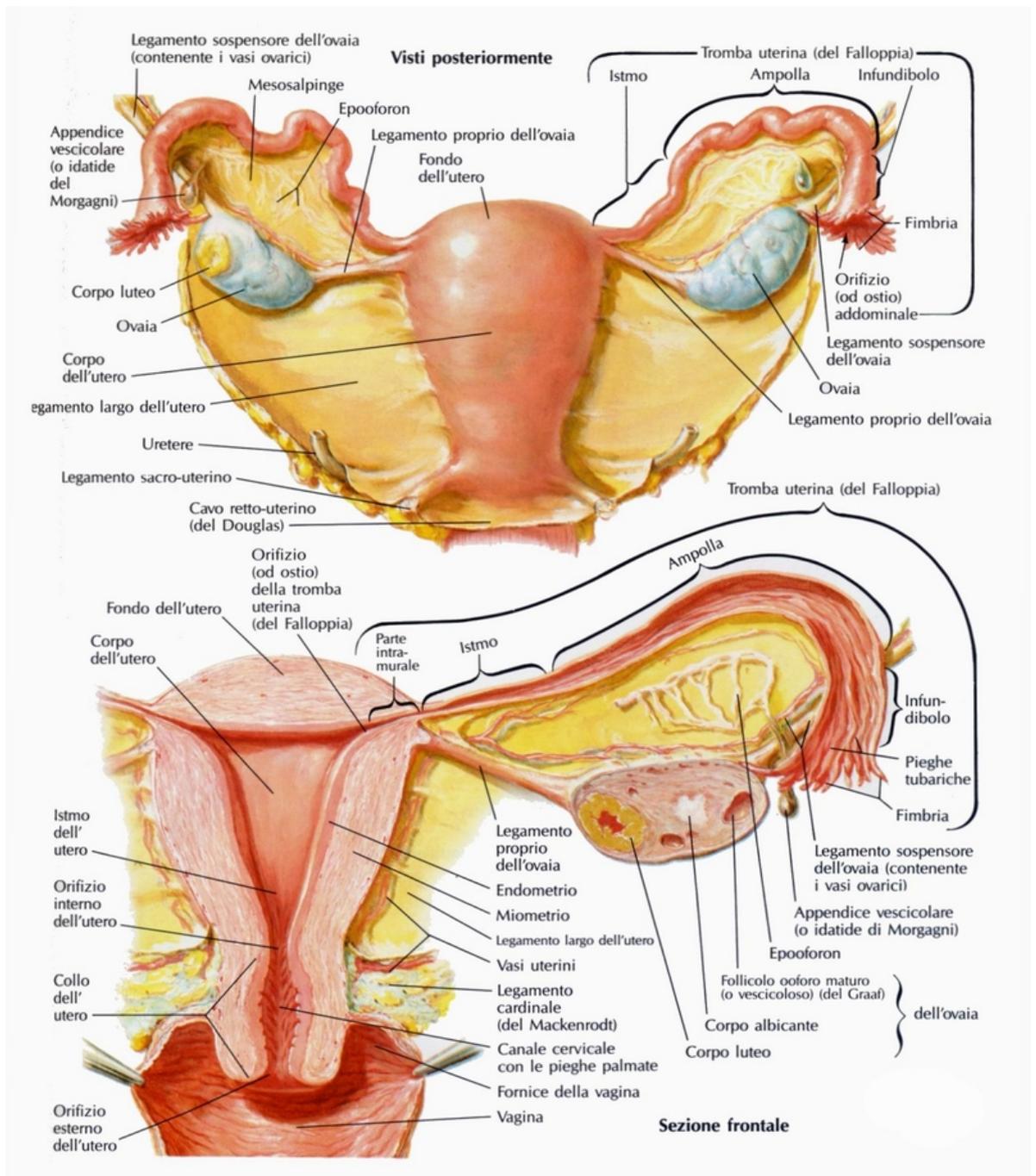
Il presente studio si propone perciò di ottimizzare le tecniche di crioconservazione, di reimpianto per minimizzare i danni che il tessuto ovarico subisce durante l'intera procedura, al fine di ottenere un tessuto in grado di rivascularizzarsi nel minor tempo possibile, garantendo così una tempestiva e duratura ripresa della funzionalità ovarica.

## **1.INTRODUZIONE**

### **1.1 Gonadi femminili: le ovaie**

Sono organi pari situate all'interno della pelvi, ai lati dell'utero a stretto contatto con i padiglioni delle tube, a forma di oliva (circa 3x2 cm). Sono contenute nel legamento largo dell'utero e legate all'utero da un peduncolo detto mesovario, una piega peritoneale attraverso la quale passano i vasi sanguigni dell'organo (**Figura 1**). L'ovaio ha una duplice fonte di irrorazione: l'arteria genitale (ovarica) e il ramo ovarico dell'arteria uterina. L'arteria genitale raggiunge l'estremità superiore dell'ovaio, penetrando nel mesovario, dove decorre inoscolandosi con il ramo ovarico dell'arteria uterina, col quale forma un'arcata da cui nascono i rami che penetrano nell'ilo e si distribuiscono al parenchima ovarico. Il ramo ovarico seguendo il legamento utero-ovarico, raggiunge il mesovario per anastomizzarsi con l'arteria ovarica. A livello intraovarico sono visualizzabili piccole arteriole. L'epitelio superficiale che ricopre l'ovaio è detto epitelio germinativo, sotto è presente una capsula connettivale fibrosa detta tonaca albuginea che contiene il parenchima ovarico. Nel parenchima è possibile riconoscere una zona corticale ricca di cellule, caratterizzata dalla presenza dei follicoli ovarici contenenti gli ovociti e una zona midollare (occupante la zona centrale dell'organo), formata da tessuto connettivale lasso frammisto a fibrocellule muscolari lisce e in essa penetrano i nervi, vasi linfatici e sanguigni, i quali danno origine a capillari che raggiungono i follicoli.

La zona corticale è formata da: lo stroma (tessuto connettivo di supporto), cellule stromali (simili a fibroblasti), follicoli ovarici costituiti da un oocita circondato da cellule follicolari o della granulosa a vari stadi di sviluppo, corpi lutei e follicoli atresici (Netter H. Frank, 2002).



**Figura1.** Anatomia dell'apparato riproduttore femminile.

### *Oogenesi e Maturazione Follicolare*

I follicoli ovarici, rappresentano l'unità funzionale dell'ovaio e sono dotati di una duplice funzione:

- ✓ funzione riproduttiva o gametogenica con formazione dell'ovocita maturo (gameti femminili).
- ✓ funzione steroidogenica o endocrina con sintesi e secrezione degli ormoni steroidei sessuali femminili estrogeni e progesterone che inducono la maturazione dei caratteri sessuali secondari e le modificazioni dell'apparato riproduttivo necessarie per la fecondazione e per l'impianto dell'ovulo fecondato.

La follicologenesi inizia durante la 4<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> settimana di vita intrauterina a livello delle gonadi indifferenziate dove avviene la oogenesi o gametogenesi con trasformazione delle cellule germinali primordiali in ovogoni che vanno incontro alla 1<sup>a</sup> divisione meiotica fino alla fase di diplotene con formazione ed espulsione del primo globulo polare che dimezza il patrimonio cromosomico dell'ovocita primordiale trasformandosi in ovociti primari circondati dalle cellule follicolari, dando origine a ~ 6-7 milioni di follicoli primordiali, molti dei quali vanno incontro a degenerazione durante la vita fetale. Infatti alla nascita avremo ~ 2 milioni di follicoli primordiali di cui la maggior parte va incontro a degenerazione poiché non viene stimolata dall'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, infatti alla pubertà avremo ~ 300.000 follicoli primordiali di cui ~ 500 andranno incontro a completa maturazione durante il periodo fertile della donna (oogenesi), mentre i follicoli residui vanno incontro ad atresia.

Il ciclo ovarico (ritmo infradiano) è un complesso meccanismo che si verifica a partire dal menarca (inizio del periodo fertile: 10-16 anni), prosegue per tutta la vita fertile della donna, tranne durante la gravidanza, e si esaurisce progressivamente a partire dalla menopausa con completa degenerazione dei follicoli residui.

Durante il ciclo ovarico si ha la maturazione del follicolo primordiale con espulsione dell'ovocita maturo (**Figura 2**), associata alla secrezione di ormoni steroidei cioè estrogeni, progesterone e androgeni che hanno il compito di preparare l'endometrio per accogliere l'ovocita fecondato, per cui il ciclo ovarico si sovrappone al ciclo endometriale o mestruale.

Il ciclo ovarico è regolato da un complesso sistema neuroendocrino, cioè dall'asse

ipotalamo-ipofisi-ovaio: l'ormone GnRH (*gonadotropin releasing factor*) sintetizzato dai nuclei sopraottico e paraventricolare dell'ipotalamo attraverso il circolo venoso portale ipofisario raggiunge l'adenoipofisi stimolando la secrezione delle gonadotropine ipofisarie FSH (*follicle stimulating hormone*) ed LH (*luteinizing hormone*) da parte delle cellule gonadotrope che, a loro volta, stimolano la secrezione da parte delle ovaie degli ormoni steroidei sessuali femminili cioè estrogeni e progesterone.

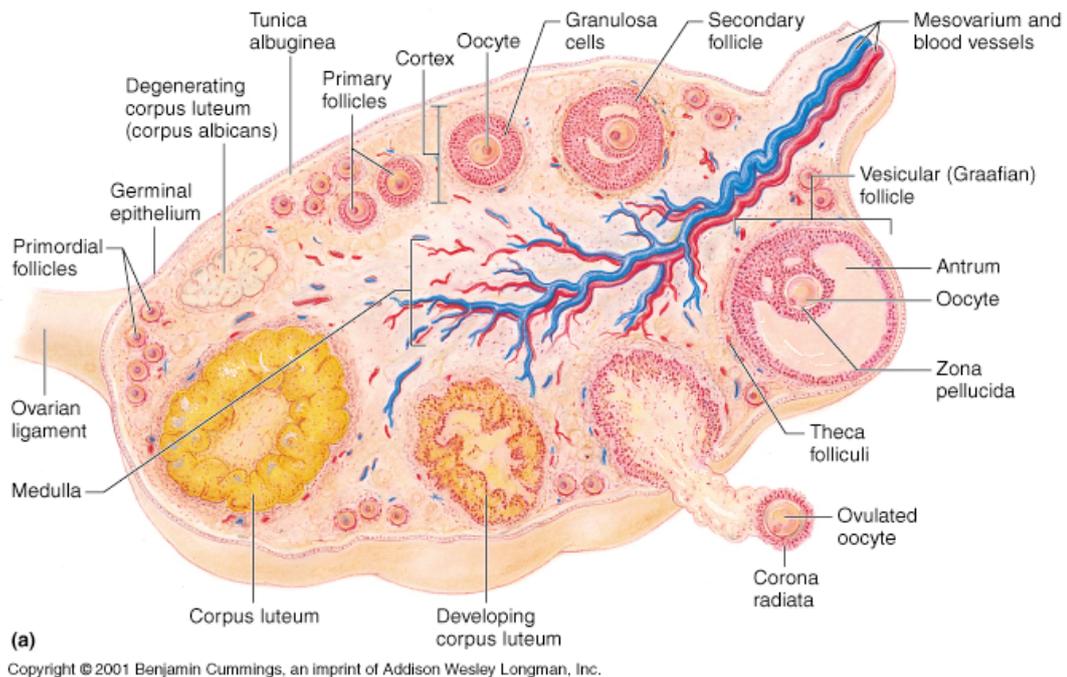
Il ciclo ovarico ha una durata media di 28 giorni ed è caratterizzato da 2 fasi:

-Fase follicolare o preovulatoria: in genere dura 14 giorni. Durante questa fase un pool di follicoli primordiali (circa 30) vengono reclutati e tra questi si seleziona un solo follicolo dominante che raggiunge la completa maturazione fino allo stadio antrale o di Graaf.

-Ovulazione: 14<sup>o</sup> giorno. Avviene la rottura del follicolo dominante con liberazione dell'uovo e migrazione nell'ampolla della tuba uterina in attesa di una eventuale fecondazione.

-Fase luteinica: dura 14 giorni, corrisponde al periodo compreso tra il 15<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> giorno del ciclo mestruale. Dopo l'ovulazione il follicolo si riempie di sangue proveniente dai capillari sanguigni della teca interna formando il corpo emorragico, si ha la proliferazione delle cellule luteiniche che funzionano come una ghiandola endocrina, producendo il progesterone indispensabile per la preparazione dell'endometrio all'annidamento dell'embrione

Per cui se l'uovo non viene fecondato si ha la fase di luteolisi con involuzione o degenerazione del corpo luteo verso il 26<sup>o</sup>-27<sup>o</sup> giorno del ciclo mestruale (8 giorni dopo l'ovulazione), mentre se l'ovocita viene fecondato e si instaura una gravidanza, non si ha l'atrofia del corpo luteo la formazione del corpo luteo gravidico (Netter H. Frank, 2002).



**Figura 2.** Ovaio e maturazione follicolare.

### *Anomalie della Funzione Ovarica e Mestruale*

Le alterazioni del ciclo mestruale possono essere classificate in:

- alterazioni della durata o ritmo del ciclo: amenorrea, oligomenorrea, polimenorrea,
- alterazioni della quantità e durata del flusso: ipermenorrea, ipomenorrea,
- sanguinamenti uterini anomali: menorragia, metrorragia, menometrorragia, *spotting*.

L'amenorrea è la totale assenza del flusso mestruale nel periodo fertile della donna distinta in amenorrea primaria e secondaria.

L'amenorrea primaria è la mancata comparsa del menarca o primo flusso mestruale entro il 16° anno di età in una ragazza con normale sviluppo dei caratteri sessuali secondari oppure entro il 14° anno di età in assenza dei caratteri sessuali secondari, dovuta a cause organiche o funzionali.

L'amenorrea secondaria è l'assenza del flusso mestruale per almeno 3 mesi in donne che hanno dei cicli mestruali regolari (Netter H. Frank, 2002).

### *La menopausa*

La menopausa è l'ultimo flusso mestruale fisiologico della vita biologica femminile ma sono necessari almeno 12 mesi di amenorrea per poter porre diagnosi di

menopausa che insorge nelle donne con età media di 49 anni, con variazioni tra 45 e 53 anni. Si parla di menopausa precoce se la avviene prima dei 40 anni dovuta a cause genetiche per anomalie del cromosoma X, malattie autoimmunitarie come le tiroiditi, ipotiroidismo, insufficienza cortico-surrenalica, malattie metaboliche come la galattosemia o a fattori di rischio come alcol, fumo, stress, droghe. Poi abbiamo la menopausa chirurgica o indotta da isterectomia, ovariectomia in una donna in precedenza fertile, iatrogena da chemioterapia o radioterapia con soppressione della funzione ovarica.

I sintomi sono correlati alla carenza di estrogeni e sono distinti in sintomi precoci e tardivi:

I sintomi precoci si hanno in premenopausa: vampate di calore da ipoestrogenismo con alterazioni vasomotorie, disfunzione dei centri termoregolatori e della dispersione di calore, insonnia fino a disturbi psicologici cioè alterazioni del tono dell'umore, irritabilità, ansia, depressione, cefalea, affaticabilità, vertigini, parestesie, disturbi della sfera sessuale di natura psicologica come la diminuzione del desiderio, eccitamento e piacere sessuale o di natura organica da atrofia e secchezza vaginale con dispareunia cioè rapporti sessuali difficoltosi e dolorosi.

I sintomi tardivi si hanno in post-menopausa: alterazioni dei tessuti connettivi, manifestazioni genito-urinarie, osteoporosi, aumentata incidenza di malattie cardiovascolari, aterosclerotiche, IMA e malattie cerebrovascolari.

La Terapia della sindrome menopausale è ormonale sostitutiva con estroprogestinici somministrati per via orale o per via parenterale transdermica (cerotti) in maniera ciclica:

La terapia ormonale sostitutiva è indicata per attenuare o eliminare i disturbi della sindrome menopausale, prevenire le malattie cardiovascolari, insorgenza di neoplasie dell'utero e ovaie, prevenire l'osteoporosi (Netter H. Frank, 2002).

## **1.2 Amenorrea, Menopausa precoce, Sterilità e terapia antineoplastica**

Un recente rapporto dell'Associazione Italiana Registri Tumori, attesta che 1 donna ogni 4 ha la probabilità di ammalarsi di tumore, mentre la probabilità di morire riguarda 1 donna ogni 11. I tumori più frequenti tra i 20-44 anni sono carcinoma della mammella, linfomi, melanomi e leucemie. La diagnosi precoce e l'introduzione di

nuovi protocolli terapeutici hanno portato all' 80% la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi, nei soggetti con età inferiore a 50 anni (<http://www.registri-tumori.it/cms/>). Tali trattamenti citotossici possono però compromettere severamente o eradicare del tutto il potenziale riproduttivo delle pazienti. I danni a carico dell'ovaio si traducono a livello clinico in amenorrea, sintomi climaterici, aumento del livello delle gonadotropine e bassi livelli degli estrogeni; a livello istologico nella deplezione del pool follicolare, atrofia ovarica, diminuzione delle dimensioni ovariche e fibrosi stromale. Tutti questi danni portano di conseguenza ad arresto dello sviluppo, sterilità e assenza di menarca nella bambina, perdita della fertilità e fallimento ovarico precoce (POF) nella donna adulta (Michaeli et al., 2012). Le pazienti affette da POF manifestano quindi anticipatamente tutti i sintomi delle pazienti in menopausa, talvolta amplificati dalla rapidità con cui tale condizione s'instaura e dalla giovane età: sintomi vasomotori (vampate di calore, sudorazioni profuse, sudorazioni notturne), disturbi del tono dell'umore (in senso depressivo), disturbi legati all'ipoestrogenismo (secchezza delle mucose), disturbi del sonno e disfunzioni sessuali. A queste complicanze a breve termine si associano quelle a lungo termine come osteoporosi, aumentata incidenza di eventi cerebro-cardiovascolari, invecchiamento precoce, aumentata incidenza di patologie del sistema nervoso centrale (Meirow et al., 2001).

### *La radioterapia*

La radioterapia (detta anche terapia radiante) è l'utilizzo di raggi X a scopo terapeutico. L'alta energia utilizzata porta a morte le cellule tumorali, impedendone così la fase di crescita, ma determina anche effetti collaterali e danno ai tessuti sani vicini alla zona da irradiare.

La radioterapia eseguita in zona pelvica può causare danni alle ovaie e all'utero. Il danneggiamento dell'ovaio può essere anche collegato all'esposizione a radiazioni a livello del cranio come nel trattamento dei tumori cerebrali. Queste radiazioni agendo sull'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, ad alte dosi (>35 Gy) possono ritardare la pubertà e a dosi inferiori (<20 Gy) portare a una diminuzione della produzione e secrezione dell'ormone LH determinando una ridotta fase luteinica (Bath et al., 2001).

Le conseguenze della radioterapia pelvica si traducono in diminuzione del peso e della grandezza dell'utero, diminuzione dello spessore endometriale e distruzione della vascolarizzazione uterina. Il danno alle gonadi molto sensibili alle radiazioni ionizzanti, dipende non solo dall'età della paziente ma anche dall'intensità, dose, campo d'irradiazione, e dalla scheda di frazionamento (Bath et al., 2001).

Wallace stimò che la LD<sub>50</sub> (dose letale necessaria per danneggiare la metà del pool follicolare umano) è <2 Gy. L'effettiva dose di radioterapia frazionata che instaura nel 97.5% dei casi fallimento ovarico precoce, decresce con l'aumentare dell'età della paziente al momento dei trattamenti; alla nascita l'effettiva dose sterilizzante è 23.0 Gy; dopo i 30 anni è ridotta a 14.4 Gy. La deplezione è proporzionale alle dimensioni del pool ovocitario, in tutti i casi donne che subiscono radioterapia addominale presentano un rischio di fallimento ovarico precoce del 97% (Wallace et al., 2003). La radioterapia Total Body Irradiation (TBI), addominale o pelvica, non causa solo danno ovarico, ma anche danni all'utero, quali riduzione del volume e una aumentata probabilità di ritardo nella crescita intrauterino e aborti spontanei, danno vascolare uterino e ridotta elasticità della muscolatura uterina.

Nelle bambine prepuberi una radioterapia addominale di 20-30 Gy porta nel 71% dei casi fallimento nello sviluppo fisico e nel 26% fallimento ovarico precoce all'età di 23.5 anni (Wallace et al., 1989). Nelle ragazze (postpuberi) una radioterapia addominale di 20-35 Gy causa infertilità nel 22% dei casi e dosi  $\geq 35$  Gy causano infertilità nel 32% dei casi (Chiarelli et al., 2000).

Thibaud e collaboratori hanno dimostrato che una radioterapia TBI  $\leq 10$  Gy in singola dose o frazionata prima della pubertà causa danno ovarico con una percentuale variabile del 55-80%, mentre una TBI 10-15.75 Gy sviluppa fallimento ovarico nel 90% dei casi. TBI frazionate, si sono rivelate meno tossiche sull'ovaio anche a dosi più elevate. Con TBI frazionate  $\geq 15$  Gy si presenta in ogni caso danno ovarico che chiaramente aumenta di entità all'aumentare dell'età (Thibaud et al., 1998). Un *follow up* a lungo termine, effettuato su donne che erano state irradiate con TBI a singola dose o frazionate, ha mostrato che il fallimento ovarico si sviluppa nel 90% delle pazienti.

## La chemioterapia

### Conseguenze cliniche

I farmaci chemioterapici somministrati per distruggere le cellule tumorali possono essere raggruppati in classi in base al loro meccanismo d'azione:

- Citotossici: alchilanti (interazione diretta con il DNA), antibiotici, antimetaboliti (interazione con la via biosintetica dei precursori del DNA e dell'RNA).
- Ormoni e anti ormoni.
- Antimitotici (interazione con la mitosi cellulare).

Inoltre possono essere raggruppati in base al rischio di gonatotossicità:

➤ Alto rischio

Agenti alchilanti: ciclofosfamide, ifosfamide, busulfano, clorambucile, melfalan, clormetano, procarbazine.

➤ Medio rischio

Agenti del Platino: cisplatino, carboplatino

Antracicline: doxorubicina (adriamicina)

Taxoli: paclitaxel, docetaxel.

➤ Basso rischio

Alcaloidi della vinca: vincristina, vinblastina

Antracicline: bleomicina

Antimetaboliti: metotrexato, 5-fluoracile, mercaptopurinolo.

Spesso questi farmaci sono combinati fra loro per aumentare gli effetti antitumorali ed il danno ovarico e sterilità che ne conseguono sono il prezzo da pagare per la sopravvivenza (**Tabella 1**. Fleischer et al., 2001, Blumenfeld, 2012).

TRATTAMENTO	PATOLOGIA	AMENORREA
CMF ciclofosfamide, metotrexato, 5, fluoracile	Carcinoma della mammella	<40 anni 21-71% >40 anni 100%
AC doxorubicina, ciclofosfamide	Carcinoma della mammella	<45-40 anni, 64%
MVPP/MOPP Clormetilene, vincristina/vinblastina, procarbazine, prednisolone	Linfoma di Hodgkin	39-46%
ChVPP clorambucile, vinblastina, procarbazine, prednisolone	Linfoma di Hodgkin	31%
COPP/ABVD ciclofosfamide, vincristina, procarbazine, prednisolone, doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazine	Linfoma di Hodgkin	48-77%
BEACOPP bleomicina, etoposide, doxorubicina, ciclofosfamide, vincristina, procarbazine, prednisolone	Linfoma di Hodgkin	70-90%

**Tabella1** . Effetti gonatotossici di alcuni trattamenti chemioterapici.

Studi clinici hanno indicato come l'età sia uno dei fattori più importanti nel determinare gli effetti della chemioterapia sulla funzione ovarica: con l'aumento dell'età aumenta l'incidenza di danno ovarico e d'infertilità irreversibile. Le giovani pazienti che continuano a mantenere un regolare ciclo mestruale dopo la chemioterapia, presentano comunque un rischio di menopausa precoce elevato anche dopo parecchi anni dal trattamento.

#### *Danno morfologico ovarico*

Studi condotti sugli animali hanno dimostrato che i chemioterapici causano ialinosi vascolare dei vasi corticali, fibrosi stromale e una significativa perdita sia tra i follicoli maturi sia tra quelli primordiali. I chemioterapici modificando l'apparato del fuso portano alla morte le cellule in divisione, ma il vero e proprio meccanismo d'azione per la distruzione follicolare non è ancora stato identificato anche se diverse sono le ipotesi. Il meccanismo principalmente suggerito è l'apoptosi che coinvolge le cellule della granulosa e l'ovocita (Meirow et al., 2001).

Studi ultrastrutturali, inoltre mostrano cellule follicolari rigonfie, distacco tra le cellule, sparizione di singole cellule, fagocitosi, compattamento della cromatina, distruzione diffusa dell'architettura follicolare e i follicoli primordiali sono spesso circondati da una sottile e anomala lamina basale (Familiari et al., 1993, Tilly et al., 1990). Secondo meccanismo suggerito è l'ischemia che porta a fibrosi e a una riduzione marcata del fenomeno della neoangiogenesi critica per la crescita follicolare. Nuova ipotesi suggerita per la deplezione follicolare è il meccanismo "burn-out". Essendo distrutti i follicoli *growing* vengono a mancare i fattori paracrini prodotti dalle cellule della granulosa che inibiscono il reclutamento dei follicoli primordiali. La deplezione del pool di follicoli primordiali sarebbe dovuta, quindi al loro stesso aumentato reclutamento non più regolato dal *feed-back* paracrino.

Altro meccanismo proposto è il danno subito dai vasi corticali che instaura ischemia corticale locale e fibrosi causando così perdita follicolare. Principalmente la chemioterapia induce tre specifici tipi di modificazione patologiche. 1) Ialinosi ed ispessimento dei vasi sanguigni corticali stromali, da lieve a moderata fibrosi dell'intima e l'ispessimento dello strato muscolare. Tali cambiamenti morfologici causano restringimento e obliterazione del lume vascolare. 2) Corticale ovarica in attiva proliferazione di nuovi piccoli vasi senza alcun modello di organizzazione

“neovascolarizzazione”. 3) Fibrosi focale corticale sottocapsulare con la conservazione dell'epitelio di superficie dell'ovaio. La corticale ovarica viene sostituita da fibre di collagene (Meirow et al., 2007).

### **1.3 Preservare la fertilità**

#### *Crioconservazione di tessuto ovarico*

La capacità riproduttiva di bambine e donne in età fertile che devono sottoporsi a trattamenti gonadotossici o a interventi chirurgici ginecologici demolitivi può essere preservata mediante congelamento di ovociti, embrioni o di tessuto ovarico.

Il congelamento di embrioni si può eseguire solo in pazienti post-puberi, è necessario un partner e necessita di stimolazione ovarica per il recupero di ovociti maturi in Metafase II (che non è possibile effettuare quando la chemioterapia non può essere ritardata o nel caso di tumori ormono-sensibili).

Il congelamento di ovociti permette il recupero di un esiguo numero di ovociti, non può essere effettuato in pazienti pre-puberi ed in pazienti affette da tumori ormono-sensibili (Stern et al., 2006) e consente di preservare la sola funzione gametogenica.

La crioconservazione di tessuto ovarico si presenta come una valida e applicabile alternativa al congelamento degli ovociti e degli embrioni in grado di preservare sia la funzione gametogenica che steroidogenica sia in bambine che giovani donne affette da neoplasie.

Questa procedura, diversamente dal congelamento degli ovociti, può essere realizzata in qualsiasi momento del ciclo mestruale, evitando ritardi nell'inizio della terapia antitumorale, è particolarmente consigliata nei casi di tumori ormono-sensibili e rappresenta l'unica possibilità di preservare la capacità riproduttiva nelle pazienti pre-puberi che non hanno ancora avuto il menarca (Poirot et al., 2002); entrambe le categorie di pazienti, infatti, non possono essere sottoposte a stimolazione ormonale per il recupero degli ovociti.

Un ulteriore vantaggio della crioconservazione di tessuto ovarico è il possibile recupero di follicoli primordiali, in numero tanto maggiore quanto minore è l'età della paziente, i quali contengono ovociti immaturi e quiescenti.

La crioconservazione di tessuto ovarico abbinata al reimpianto autologo rappresenta, pertanto, una metodica atta a garantire la preservazione della funzione ovarica che

può essere utilizzata, in caso di fallimento ovarico precoce, alla completa remissione della malattia, in bambine e giovani donne sottoposte a trattamenti gonadotossici (Lunardi et al., 2012).

#### *A chi è rivolta la crioconservazione di tessuto ovarico*

La crioconservazione di tessuto ovarico è indicata per pazienti affette da malattie di natura neoplastica e non:

- ✓ Neoplasie del sistema emopoietico: linfoma di Hodgkin e non Hodgkin, leucemia mieloblastica e linfoblastica acuta.
- ✓ Malattie extra-pelviche: osteosarcoma, sarcoma di Ewing, carcinoma tiroideo, renale e mammario, neuroblastoma, tumore dell'intestino.
- ✓ Malattie pelviche: neoplasie non ginecologiche come il sarcoma pelvico, sarcoblastoma, rhabdomyosarcoma, tumore sacrale, neoplasie retto-sigmoidali.
- ✓ Tumori maligni ginecologici: carcinoma precoce vaginale, vulvare e della cervice.
- ✓ Malattie infiammatorie: morbo di Chron, lupus eritematoso, artrite reumatoide.
- ✓ Anomalie cromosomiche: associate alla scarsa presenza di follicoli ovarici (sindrome di Turner completa o a mosaico).
- ✓ Cisti ovariche ricorrenti.
- ✓ Endometriosi severe (Poirot et al., 2002).

#### *Crioconservazione*

La risposta di una cellula al processo di crioconservazione cambia se essa è singola o facente parte di un tessuto: nei due casi, infatti, i parametri biofisici che governano il trasporto dell'acqua e la dinamica della formazione di ghiaccio intracellulare sono differiscono notevolmente.

Nella crioconservazione di tessuti biologici, come nelle cellule, sono di cruciale importanza due processi di trasporto: l'aggiunta/rimozione del crioprotettore e la redistribuzione dell'acqua durante il congelamento e lo scongelamento. I crioprotettori sono agenti crioprotettivi che agiscono sulle cellule diminuendo gli effetti dannosi e deleteri dovuti all'esposizione delle cellule a elevate concentrazioni

di elettroliti grazie alla loro azione colligativa: riducono la quantità di ghiaccio intracellulare a qualsiasi temperatura sotto lo zero.

Le cellule nello strato superficiale rispondono ai cambiamenti osmotici indotti dal congelamento come le cellule in sospensione, mentre le cellule all'interno di un tessuto subiscono una disidratazione solo in risposta all'aumentata tonicità delle cellule della superficie (Diller et al., 1975; Bakhach, 2009).

Di conseguenza, le cellule negli strati interni perdono acqua a un ritmo più lento rispetto alle cellule della superficie e contengono, quindi, maggiore quantità di acqua al termine del congelamento stesso.

Diversi studi hanno dimostrato un comportamento bifasico nella cinetica della permeazione del crioprotettore che suggerisce l'esistenza di compartimenti separati di diffusione nel tessuto, con diverse costanti di tempo per la diffusione.

I tempi di diffusione dipendono sia dalla composizione sia dalla geometria del tessuto e possono variare da minuti ad ore.

Il lungo tempo necessario al crioprotettore per diffondere all'interno del tessuto può avere anche effetti avversi sulla popolazione cellulare.

Sebbene una lunga esposizione ai crioprotettori sia associata ad un più alta probabilità di eventi tossici, il graduale aumento della concentrazione di soluti extracellulari dovuta agli effetti di una diffusione limitata, sembrano ridurre lo stress osmotico ed ovviare al bisogno di incrementare l'aggiunta del crioprotettore.

La crioconservazione del tessuto implica inevitabilmente un non uniforme livello di raffreddamento: all'interno del tessuto la temperatura diminuisce più lentamente rispetto alla superficie.

I danni specifici della crioconservazione di tessuto che non si riscontrano nel congelamento di cellule isolate, sono appunto danni derivati dalla limitazione nel trasporto di acqua e soluti e di calore, derivata dalle dimensioni macroscopiche del tessuto stesso (Diller et al., 1975; Bakhach, 2009).

In questo modo possono crearsi regioni non sufficientemente protette e regioni danneggiate dalla sovraesposizione ai crioprotettori.

Similmente a quanto detto, a causa di una variazione non uniforme della temperatura, sezioni troppo spesse di tessuto potrebbero subire processi di congelamento e scongelamento non ottimali.

Infine, un ulteriore problema legato alle metodiche di crioconservazione, è l'eterogeneità dei tipi cellulari formanti il tessuto: sembrerebbe impossibile procedere ad un ottimale processo di congelamento per ogni diverso tipo cellulare presente nel tessuto (Diller et al., 1975; Bakhach, 2009).

#### *Tecniche di Crioconservazione*

La principale tecnica di crioconservazione del tessuto ovarico attualmente impiegata è il congelamento lento-scongelo rapido.

#### *Congelamento lento-scongelo rapido*

Il congelamento lento prevede diversi *steps* di diminuzioni graduali della temperatura. Durante il congelamento lento i campioni biologici sono pre-equilibrati con i crioprotettori a temperature che variano tra 0 e 4°C per permettere ai crioprotettori permeanti (1.2 propandiolo, etilenglicole, dimetilsolfossido) di permeare all'interno delle cellule e sostituirsi alle molecole di acqua. Uno *step* critico del protocollo di congelamento lento è il “*seeding*”, l'induzione della formazione del primo cristallo di ghiaccio che avviene a temperature tra i -5°C e i -15°C; il campione biologico è poi portato alla temperatura di -30°C attraverso lievi decrementi di temperatura (tra 0.3 e 1°C/min) dopodiché vengono raggiunti i -175°C con diminuzioni della temperatura di 10°C/min. Durante l'applicazione del congelamento lento si assiste ad un incremento della concentrazione di crioprotettori nella fase liquida extracellulare a causa della progressiva disidratazione cellulare, ottenuta grazie ai crioprotettori non permeanti (saccarosio, trealosio), questo fenomeno è seguito dalla formazione di ghiaccio extracellulare. Considerate le condizioni del congelamento lento, la formazione spontanea di ghiaccio dovrebbe avvenire a temperature al di sotto del punto di *melting* di congelamento, questo si traduce in un massiccio rilascio di calore che può costituire una perturbazione nell'andamento del ciclo di raffreddamento; per eludere questa eventualità si ricorre al *seeding* (Coticchio et al., 2001).

Il congelamento lento permette un utilizzo di crioprotettori a basse concentrazioni; infatti si utilizzano soluzioni di congelamento con una concentrazione di crioprotettore pari a 1-2 mol/l. La tecnica in questione riduce la formazione di ghiaccio intracellulare perché promuove la formazione extracellulare dei cristalli di

ghiaccio a una temperatura sottozero elevata (circa  $-6^{\circ}\text{C}$ ) inoltre permette la formazione dell'equilibrio osmotico intra/extracellulare impedendo danni cellulari da osmosi. I passaggi che portano al congelamento servono a controllare la formazione di ghiaccio extracellulare e la grandezza dei cristalli di ghiaccio in via di formazione. Nonostante una bassa concentrazione di crioprotettori sia favorevole alla salubrità cellulare sono sicuramente da considerare i tempi totali impiegati per il congelamento lento, infatti lunghi tempi di congelamento inficiano le basse concentrazioni di crioprotettori (Shaw and Jones, 2003).

#### *Congelamento lento di fettine di corticale ovarica*

I risultati favorevoli ottenuti da studi su animali hanno incoraggiato la sperimentazione anche sull'uomo. Infatti numerose ricerche sono state effettuate per ottenere un miglior protocollo di crioconservazione del tessuto ovarico e per poter studiare la crescita e lo sviluppo follicolare in vitro.

Il primo studio sulla crioconservazione del tessuto ovarico umano fu realizzato da Hovatta (Hovatta et al., 1996), il quale dimostrò che il tessuto congelato utilizzando soluzioni contenenti 1.5M DMSO o 1.5M PROH e 0.1M saccarosio non è danneggiato in maniera significativa, indipendentemente dal tipo di crioprotettore utilizzato.

Nel 1996, Newton (Newton et al., 1996) studiò l'effetto di quattro diversi crioprotettori (DMSO, GLY, PROH, EG) sulla conservazione del tessuto e il mantenimento dell'integrità morfo-funzionale fu valutato dopo trapianto di fettine di tessuto ovarico umano congelato/scongelato in animali immunodepressi. I risultati suggerirono che non ci sono differenze significative tra DMSO, EG e PROH, mentre la riserva follicolare era significativamente diminuita nei campioni trattati con GLY. La maggior percentuale di follicoli vitali (84%) è stata ottenuta con EG mentre il trattamento con GLY, invece, diede i peggiori risultati (10%). In tutti i casi in cui il tessuto è stato congelato senza crioprotettore il pezzo era piccolo, non vitale e costituito solo da tracce di tessuto fibrotico.

Oktay, nel 1997 (Oktay et al., 1997), analizzando follicoli primordiali isolati da fettine di corticale crioconservata né dimostrò la vitalità mediante l'analisi immunoistochimica e la microscopia elettronica, indicando così che i follicoli a questo stadio maturativo non risentono in alcun modo della procedura.

Fabbri et al. nel 1999 effettuarono uno studio per verificare la sopravvivenza follicolare e il mantenimento della funzione recettoriale in fettine di corticale umana dopo crioconservazione. Furono confrontati gli effetti di due crioprotettori: PROH e DMSO. Dopo scongelamento, nel tessuto congelato con il PROH, furono rinvenuti numerosi ovociti e cellule della granulosa vitali. Al contrario, nei campioni trattati con DMSO, fu osservata un'alta percentuale di ovociti con cromatina densa e segni di degenerazione nucleare. In conclusione la miglior preservazione delle cellule della granulosa e degli ovociti fu ottenuta usando PROH piuttosto che DMSO. Tale protocollo ha permesso di evidenziare il mantenimento della funzione recettoriale (Fabbri et al., 1999A). Nello stesso anno, questi risultati furono confermati in un secondo studio, eseguito per valutare la sopravvivenza follicolare, il mantenimento della funzione recettoriale e la possibilità di isolamento enzimatico/meccanico dei follicoli. La valutazione morfologica dimostrò che il DMSO forniva una preservazione accettabile ma non ottimale sia dei follicoli sia degli ovociti (Fabbri et al., 1999B).

Altri studi furono effettuati per valutare, mediante osservazioni di tipo istologico, gli effetti di diverse condizioni di disidratazione e di diverse velocità di congelamento su sottili fettine di corticale ovarica umana crioconservate con PROH (Gook et al., 1999). Le fettine di corticale, dopo disidratazione, furono caricate in *vials* e congelate usando: (A) bassa velocità, (B) velocità intermedia (sospendendo i *vials* prima in vapori di azoto per 12 ore e poi immergendoli in azoto liquido), (C) alta velocità (immergendo i *vials* direttamente in azoto liquido). È stato così dimostrato che un unico *step* di disidratazione con 1.5 mol/l PROH + 0.1 mol/l saccarosio per 90 minuti, seguito da congelamento lento e scongelamento rapido, ha consentito di ottenere il più alto numero di follicoli primordiali e primari intatti. Questi studi confermarono che il tessuto ovarico è resistente ai processi di crioconservazione e che un alto numero di follicoli risulta vitale nel tessuto umano dopo congelamento/scongelamento (Newton et al., 1996; Hovatta et al., 1996).

Nel 2000, i risultati ottenuti da Gook indicarono che, nonostante si ottenga una buona percentuale di sopravvivenza delle cellule della granulosa e degli ovociti, mediante una bassa velocità di congelamento, questa non è ideale per il mantenimento delle altre cellule della corticale (Gook et al., 2000). Così, come suggerito da Bakhach nel

2009, il miglior regime di crioconservazione, non è quello che preserva nel miglior modo le singole cellule, ma è quello in grado di garantire l'integrità dell'organo nel complesso, nel caso specifico di tutte le cellule che costituiscono la corticale ovarica (Bakhach, 2009).

Nel 2003, Fabbri e collaboratori condussero uno studio volto a valutare l'efficienza della tecnica di crioconservazione di tessuto ovarico umano. Mediante analisi immunoistochimica e istologica, è stato analizzato il grado di preservazione dei follicoli e del tessuto stromale dopo congelamento/scongelo. In particolare, è stato valutato il mantenimento dell'antigenicità dell'ovaio, usando anticorpi anti-ER (estrogeni) ed anti-PR (progesterone), la proliferazione cellulare, mediante l'antigene antiproliferativo Ki67 e l'attività anti-apoptotica, mediante l'anti-proteina Bcl2. I campioni di tessuto sono stati congelati usando una combinazione di PROH e saccarosio come crioprotettori ed è stato eseguito un protocollo di congelamento lento/scongelo rapido. È stato notato che la morfologia follicolare e stromale del tessuto scongelato era buona e comparabile a quella del tessuto fresco. Non sono state trovate differenze significative nella densità follicolare, nella distribuzione e nel diametro dei follicoli del tessuto scongelato rispetto al fresco. I dati ottenuti hanno confermato il successo delle procedure di congelamento/scongelo in soluzioni contenenti PROH e saccarosio (Fabbri et al., 2003).

Nel 2003, Hreinsson confrontò gli effetti dell'aggiunta di due diversi supporti proteici, siero umano (HS) [20% (v/v)] e albumina sierica umana (HSA) (25 mg/ml), alla soluzione di crioconservazione contenente 1.5M PROH e 0.1M saccarosio, per valutare se i medium privi di siero potessero essere usati per la preservazione dei follicoli nella corticale ovarica umana. Dopo scongelamento, non è stata osservata alcuna differenza sostanziale tra la crioconservazione effettuata con soluzioni contenenti siero umano e quella effettuata con l'albumina sierica umana; infatti in entrambi i casi si è notato un elevato numero di follicoli vitali (Hreinsson et al., 2003).

Nel 2003, Abir confrontò lo sviluppo e la sopravvivenza di follicoli fetali umani congelati/ scongelati con DMSO o PROH e trapiantati in topi immunodepressi, i quali sono stati successivamente trattati con FSH, al fine di valutare gli effetti della somministrazione di FSH e comparare il trapianto di tessuto in due diversi siti: rene e

tessuto sottocutaneo. Questo è stato il primo *report* che ha dimostrato lo sviluppo di follicoli fetali umani trapiantati in topi immunodepressi; la procedura di congelamento/scongelo con PROH sembra supportare meglio lo sviluppo e la vitalità, rispetto a quella con DMSO (Abir et al., 2003).

Nel 2006 Fabbri condusse un nuovo studio, al fine di migliorare le soluzioni di crioconservazione. Sono stati confrontati differenti supporti proteici a differenti concentrazioni; soluzione A: 30% HS; soluzione B: 20% HS; soluzione C: 20% Fetal Calf Serum (FCS). Lo stesso gruppo ha precedentemente eseguito un ulteriore studio in cui ha dimostrato che l'FCS costituisce il miglior supporto proteico, paragonato a Plasmanate o Siero Sintetico (Fabbri et al., 2006A). Il tessuto ovarico è stato ottenuto, mediante laparoscopia, da 14 pazienti affette da diverse patologie neoplastiche. Tutti i campioni sono stati crioconservati usando un protocollo di congelamento lento/scongelo rapido, utilizzando le tre soluzioni descritte sopra (A,B,C), addizionate da PROH e saccarosio. I risultati hanno indicato che il 30% di HS (soluzione A) ha un effetto protettivo significativamente più alto rispetto al 20% di FCS (C) ( $p < 0,05$ ) e un rendimento più alto in confronto al 20% di HS (B). Mettendo in relazione l'età delle pazienti con i differenti trattamenti, il 30% di HS si è rivelato particolarmente efficace nelle pazienti più giovani. È stato, quindi, dimostrato che l'uso di concentrazioni più alte di siero umano, nelle soluzioni di crioconservazione, dà un più alto tasso di sopravvivenza dei follicoli nel tessuto ovarico scongelato (Fabbri et al., 2006B).

Nel 2010 Fabbri et al., hanno allestito prove di crioconservazione tissutale con diverse soluzioni di congelamento, modificando le concentrazioni di PROH, saccarosio, e siero umano e valutando gli effetti sulla preservazione delle diverse strutture cellulari, mediante microscopia ottica ed elettronica. I risultati hanno evidenziato come la soluzione di congelamento base (1.26 M PROH + 0.175 M SACCAROSIO + 30% HS) sia quella che consente di ottenere i risultati migliori in termini di preservazione stromale e follicolare (Fabbri et al., 2010A).

#### *Impieghi del tessuto ovarico umano crioconservato*

Il tessuto ovarico umano crioconservato una volta scongelato, può essere utilizzato, nei seguenti modi.

*Reimpianto orto topico.* Il tessuto ovarico scongelato è reimpiantato nella sua sede originaria, l'ovaio, oppure in una tasca nel peritoneo pelvico della fossetta ovarica. In questo caso è possibile sia ripristinare la funzionalità endocrina, evitando così la necessità di ricorrere a terapie ormonali sostitutive, sia riacquistare la naturale capacità di concepire.

*Reimpianto etero topico.* Il tessuto ovarico scongelato è reimpiantato in una sede particolarmente vascolarizzata diversa da quella originaria (sottocute dell'addome o dell'avambraccio, sotto la borsa omentale, sotto la capsula renale, sulla superficie del muscolo deltoide, sulla superficie anteriore dell'utero). In questo modo è possibile ottenere solamente la ripresa dell'attività endocrina e, per l'instaurarsi di una gravidanza, si deve ricorrere a tecniche di fecondazione assistita.

*Sviluppo e maturazione in-vitro di follicoli ovarici.* Questo metodo consentirebbe di recuperare esclusivamente la funzione gametogenica, poiché dai follicoli posti in coltura e portati a completa maturazione verrebbero prelevati ovociti in metafase II, da utilizzare in un programma di fecondazione in vitro. Questa tecnica rimane a tutt'oggi del tutto sperimentale (Fabbri et al., 2010B).

Attualmente il numero dei reimpianti di tessuto ovarico eseguiti in tutto il mondo è sconosciuto poiché l'ultimo dato riportato da Bedaiwy, risale al 2008, il quale riferisce che 43 donne si siano sottoposte a reimpianto di tessuto ovarico (Bedaiwy et al., 2008). In letteratura sono attualmente descritte 20 nascite da reimpianto di tessuto ovarico crioconservato ortotopico (22 risultano da dati non pubblicati) e nessuna da reimpianto eterotopico e l'induzione della pubertà in 2 bambine con entrambe le metodiche.

#### *Reimpianto ortotopico*

La prima gravidanza, in seguito a reimpianto ortotopico di tessuto ovarico crioconservato, fu riportata nel 2004 da Donnez. Nel 1997, frammenti di biopsia di corticale ovarica, prelevati da una donna di 25 anni affetta da linfoma di Hodgkin, sono stati crioconservati prima dell'inizio della chemioterapia. In seguito al trattamento terapeutico, la paziente è andata incontro a fallimento ovarico precoce (POF) e nel 1998, ha iniziato la terapia ormonale sostitutiva che è continuata fino al

2001, quando la paziente esprime il desiderio di una gravidanza. Nel 2003, a completa remissione della malattia, è stato eseguito il reimpianto ortotopico di corticale ovarica congelata/scongelata attraverso due *step* di laparoscopia. Una settimana prima del reimpianto la paziente è stata sottoposta a una prima laparoscopia con l'intento di creare una tasca peritoneale all'interno della quale sarebbe stato reimpiantato il tessuto. Lo scopo di questo primo intervento era, secondo gli autori, di favorire l'angiogenesi e la rivascularizzazione nell'area del reimpianto.

Dopo circa 5 mesi dal reimpianto autologo di 35 fettine di corticale ovarica, i livelli di FSH e LH erano significativamente minori di quelli osservati prima dell'intervento e a distanza di 11 mesi la paziente rimase gravida in modo naturale e ha concepito una bambina sana (Donnez et al., 2004).

Nel luglio 2005, Meirow ha descritto la seconda nascita, ottenuta da reimpianto ortotopico di corticale ovarica scongelata, in una donna di 28 anni con POF indotto da alte dosi di chemioterapici per la cura di un linfoma non-Hodgkin. La paziente è stata sottoposta a un primo ciclo di chemioterapia convenzionale per 12 settimane. Dopo 6 mesi dalla fine della chemioterapia la malattia ha recidivato e la paziente è stata sottoposta a un secondo ciclo di chemioterapia convenzionale, seguito da chemioterapia ad alte dosi e trapianto autologo di cellule staminali. Al termine del secondo ciclo di chemioterapia convenzionale è stato deciso di crioconservare il tessuto ovarico. Al termine della chemioterapia ad alte dosi la paziente è andata incontro a POF. Nel 2003 è stata effettuata una laparotomia e 4 fettine di tessuto scongelato sono state reimpiantate sull'ovaio sinistro e piccoli frammenti furono inseriti nell'ovaio destro. A distanza di 6 mesi dal reimpianto le analisi hanno dimostrato la ripresa della funzionalità ovarica. Dal tessuto reimpiantato, dopo 8 mesi, è stato recuperato un ovocita maturo, da cui mediante fecondazione in vitro è stato ottenuto un embrione, che trasferito in utero, ha portato a gravidanza e alla nascita di una bambina sana (Meirow et al., 2005).

Nel 2007, Demeestere ha riportato altre due nascite, in seguito a trapianto orto/eterotopico di tessuto ovarico crioconservato, in una donna di 31 anni affetta da linfoma di Hodgkin.

Dopo un primo ciclo di chemioterapia la paziente è stata sottoposta a crioconservazione di tessuto ovarico ed in seguito ha eseguito altri 5 cicli di

chemioterapia, ma la malattia ha recidivato. Si proseguì quindi con chemioterapia ad alte dosi e trapianto autologo di midollo osseo.

Nel 2002 i livelli ormonali hanno mostrato menopausa anticipata e la paziente ha iniziato una terapia ormonale sostitutiva. Nel 2004 si è sottoposta ad un primo reimpianto orto/eterotopico in due *step* di laparoscopia.

In un primo intervento è stata creata nel peritoneo pelvico della fossa ovarica una tasca e contemporaneamente l'ovaio sinistro è stato inciso longitudinalmente in modo da creare una tasca dove reimpiantare i frammenti.

Una settimana dopo è stata effettuata la seconda laparoscopia: 3 frammenti sono stati suturati nell'incisura dell'ovaio sinistro, 9 nella tasca peritoneale e 6 in un sito sottocutaneo della parete addominale destra. Quattro mesi dopo, in tutti i siti di reimpianto si è osservato sviluppo follicolare e i livelli ormonali hanno mostrato una ripresa della funzionalità ovarica. Otto mesi dopo il reimpianto, la paziente ha avuto un ciclo ovulatorio spontaneo; successivamente la paziente è rimasta gravida ma la gravidanza si è interrotta dopo 7 settimane. Un anno dopo il primo reimpianto i livelli di FSH e Inibina B hanno indicato un esaurimento follicolare del tessuto reimpiantato. Quindi, nel 2006, è stato eseguito un secondo reimpianto: 2 frammenti di corticale ovarica sono stati suturati nell'ovaio sinistro, altri 2 in un sito sottocutaneo della parete addominale sinistra.

Durante il quinto ciclo ovulatorio spontaneo la paziente è rimasta gravida e ha partorito una bambina sana.

Trenta-tre mesi dopo il secondo reimpianto, la paziente è rimasta nuovamente gravida spontaneamente e ha partorito un'altra bambina. (Demeestere et al., 2007, 2010).

Andersen e collaboratori, nel 2008, hanno riportato la nascita di altri 3 bambini da due pazienti affette rispettivamente da sarcoma di Ewing e linfoma di Hodgkin.

La prima paziente, all'età di 26 anni, si è sottoposta alla crioconservazione, prima dell'inizio dei trattamenti chemioterapici. E' stata sottoposta a 9 cicli di chemioterapia e, nel 2005, le fu reimpiantato il tessuto in laparoscopia: 6 pezzi di corticale ovarica sono stati suturati in due tasche ottenute nell'ovaio destro. Durante il secondo ciclo mestruale la paziente ha iniziato la stimolazione ovarica, e da questa furono ottenuti 2 ovociti fertilizzati in vitro.

Un embrione di 3 cellule trasferito in utero ha portato a una gravidanza con la nascita di una bambina sana. Due anni dopo la paziente è rimasta nuovamente gravida, spontaneamente, e ha dato alla luce un'altra bambina.

La seconda paziente, all'età di 27 anni, decise di crioconservare il tessuto ovarico dopo aver effettuato 6 cicli di chemioterapia, ma prima chemioterapia di condizionamento per il trapianto di midollo osseo. Trascorsi 18 mesi dalla crioconservazione, 10 pezzi di corticale furono reimpiantati in due tasche create nell'ovaio destro. Cinque mesi dopo il reimpianto i livelli ormonali indicarono ripresa della funzionalità ovarica e 15 mesi dopo il primo reimpianto la paziente, sebbene il tessuto fosse ancora funzionante, decise di sottoporsi a un secondo reimpianto.

Successivamente la paziente iniziò un nuovo ciclo di stimolazione ovarica, dal quale fu recuperato un ovocita maturo che fertilizzato fu trasferito portando alla nascita di un bambino sano (Andersen et al., 2008; Ernst et al., 2010).

Nel 2008, Silber riportò una nascita da una paziente di 25 anni affetta da fallimento ovarico precoce (POF) alla quale era stato reimpiantato, per via laparoscopia, il tessuto crioconservato prelevato dalla sorella gemella 3 anni prima; 4 mesi dopo il reimpianto i valori ormonali tornarono a livelli premenopausali e un mese dopo la paziente concepì spontaneamente. Un anno e mezzo dopo il reimpianto, però, i suoi livelli ormonali risultarono essere quelli di una donna in menopausa e si decise di effettuare un secondo reimpianto (Silber et al., 2008).

Nel 2009 Piver ha riportato la nascita di una bambina in una paziente di 27 anni affetta da poliangite microscopica; dopo un primo ciclo di chemioterapia con ciclofosfamide la paziente è stata sottoposta a crioconservazione. Nel 2003, al termine dei trattamenti antitumorali, i livelli ormonali hanno confermato la menopausa e otto anni e mezzo dopo crioconservazione, il tessuto è stato reimpiantato attraverso 2 *step* di laparoscopia inserendo frammenti di corticale ovarica sulle ovaie e in due tasche peritoneali. Quattro mesi e mezzo dopo è stato osservato un decremento dei livelli di gonadotropine e un aumento dei livelli di estradiolo. Nove mesi dopo il reimpianto la paziente ha iniziato la stimolazione con gonadotropine dalla quale è stato recuperato un ovocita, che fertilizzato e trasferito è risultato in una gravidanza che ha portato alla nascita di una bambina sana (Piver et al., 2009).

Nel Giugno 2009, Roux riportò una nascita in una paziente affetta da anemia falciforme e sottoposta a terapia di condizionamento per il trapianto allogenico di midollo osseo.

Dopo il trapianto di midollo osseo la paziente andò incontro a POF e iniziò la terapia ormonale sostitutiva. All'età di 20 anni la paziente si sottopose a crioconservazione e nel 2008 fu effettuato il reimpianto in due *step* di laparoscopia. Quattro mesi più tardi fu osservata ripresa della funzionalità ovarica e si decise di interrompere la terapia ormonale; al secondo ciclo mestruale spontaneo la paziente rimase gravida e partorì una bambina sana (Roux et al., 2009).

Nel 2010 Silber riportò la nascita di un altro bambino sano in una paziente di 20 anni affetta da Linfoma di Hodgkin; nel 2008, prima dell'inizio dei trattamenti, il tessuto ovarico fu crioconservato; al termine dei trattamenti la paziente presentava amenorrea e insufficienza ovarica. Nel 2009, al termine dei trattamenti, il tessuto fu reimpiantato in due *step* di laparoscopia; tre mesi e mezzo dopo fu rilevata funzionalità ovarica e 8 mesi dopo la paziente rimase gravida spontaneamente, dando alla luce un bambino sano (Silber et al., 2010). Grynberg, nel 2012, riporta la nascita di un secondo bambino per questa paziente (Grynberg et al., 2012).

Nello stesso anno Sanchez-Serrano, riportò la nascita di due gemelli in una donna affetta da carcinoma mammario, che si era sottoposta, all'età di 36 anni, a crioconservazione prima di iniziare la chemioterapia. In seguito al reimpianto, a numerosi cicli di stimolazione ormonale e una fecondazione in vitro, furono trasferiti in utero due embrioni e si instaurò una gravidanza gemellare che si concluse con la nascita di due bambini sani (Sanchez-Serrano et al., 2010).

Donnez nel 2010 riportò la nascita di un bambino sano in una paziente affetta da tumore neuroectodermico dell'orbita destra, trattato chirurgicamente e con radioterapia. All'età di 19 anni la donna si sottopose a crioconservazione di tessuto ovarico. A causa della presenza di metastasi, la paziente ha effettuato una chemioterapia prima di sottoporsi a trapianto ematopoietico di cellule staminali. Nel 2008 è stato effettuato il reimpianto per via laparoscopica in 2 *step* grazie al quale si è ristabilita la funzionalità ormonale e nel 2010 la paziente ha portato a termine una gravidanza dopo concepimento spontaneo (Donnez et al., 2011).

Un'altra nascita fu riportata nel 2011 da Revel in una ragazza di 19 anni, affetta da Talassemia Major, che nel 2002 decise di crioconservare il tessuto ovarico.

Dopo chemioterapia e trapianto allogenico di cellule staminali andò incontro a POF e decise quindi di reimpiantare il tessuto. Dopo il terzo reimpianto e al quarto ciclo di stimolazione ormonale, due embrioni di buona qualità furono trasferiti in utero, portando una gravidanza che si concluse con la nascita di un bambino sano (Revel et al., 2011). Anche per questa paziente Grynberg riporta la nascita di un secondo bambino (Grynberg et al., 2012).

Muller, nel 2012, riporta la nascita di un bambino da una paziente di 25 anni affetta da recidiva di linfoma di Hodgkin. Prima della chemioterapia ad alte dosi la paziente si è sottoposta a crioconservazione. Cinque anni dopo il tessuto ovarico è stato scongelato e reimpiantato creando una tasca peritoneale nella fossetta ovarica destra; tre mesi dopo ha avuto il primo ciclo mestruale spontaneo. Sei mesi dopo il trapianto, dopo due cicli mestruali normali, si è deciso di iniziare il trattamento con basse dosi di FSH al fine di promuovere la maturazione follicolare. L'ovulazione è stata poi indotta con gonadotropina corionica umana (HCG), dopo di che la paziente ha concepito naturalmente (Muller et al., 2012).

L'ultima nascita è stata riportata a Maggio 2012 da Donnez. Una paziente di 28 anni, in seguito alla diagnosi di ascessi ovarici, si è sottoposta a crioconservazione. Sette anni dopo è stato effettuato il reimpianto di 6 frammenti inseriti in una tasca peritoneale nel legamento largo dell'utero e la ripresa della funzionalità del tessuto iniziò 6 settimane dal reimpianto. In seguito al quinto ciclo di stimolazione con FSH e GnRH furono recuperati 2 ovociti maturi, fertilizzati e un embrione a 7 cellule fu trasferito in utero portando a una gravidanza che si concluse con la nascita di un bambino sano (Donnez et al., 2012).

Nel 2012 Revelli riporta la nascita di una bambina in seguito a reimpianto di tessuto crioconservato in una ragazza affetta da  $\beta$ -Talassemia. La paziente all'età di 21 anni, prima di iniziare la chemioterapia di condizionamento (con alchilanti) per essere sottoposta a trapianto di midollo osseo allogenico, decise di crioconservare il tessuto ovarico. Nelle settimane successive al reimpianto i livelli di gonadotropine si innalzarono e incominciarono a manifestarsi i primi sintomi menopausali. Si decise così, di prescrivergli una terapia sostitutiva. All'età di 29 anni, la paziente dichiarata

completamente in remissione dalla malattia, chiese il reimpianto del tessuto crioconservato che fu eseguito nel marzo 2010, dopo la sospensione della terapia ormonale, secondo le modalità descritte da Donnez (Donnez et al., 2006). Nei mesi successivi, i livelli delle gonadotropine scesero e le ecografie mostrarono follicoli in via di sviluppo. Sedici mesi dal reimpianto la paziente rimase gravida e diede alla luce una bambina sana (Revelli et al., 2012).

Nel 2012 Ernst riporta la prima induzione di pubertà dopo reimpianto ortotopico in una bambina affetta da sarcoma di Ewing andata incontro a fallimento ovarico dopo chemio radioterapia. All'età di 9 anni alla bambina fu prelevato un ovaio intero mentre il rimanente fu completamente distrutto dalle terapie. All'età di 14 anni la paziente non mostrava ancora alcun segno di pubertà e i livelli delle gonadotropine erano quelli menopausali, si decise quindi reimpiantare il tessuto crioconservato. A quattro mesi dal reimpianto i livelli delle gonadotropine erano tornati a livelli normali e nel corso del successivo anno comparvero i primi caratteri secondari sessuali e il menarca. Tuttavia diciannove mesi dal trapianto il tessuto reimpiantato cessò di funzionare (Ernst et al., 2013).

Nel febbraio 2013, è riportata la prima nascita ottenuta in Australia da reimpianto di tessuto ovarico. Nel 2005, all'età di 37 anni a una paziente fu diagnosticato un carcinoma mammario duttale invasivo con recettori estrogeno-progestinici positivi. Prima dell'inizio della chemioterapia la paziente si sottopose a crioconservazione di tessuto ovarico, che le fu reimpiantato nel 2012 mediante una minilaparotomia, dopo anni di menopausa conclamata. Passati alcuni mesi dal reimpianto, intrapresa la decisione di stimolare la paziente con Letrozolo, furono recuperati due ovociti, di cui uno maturo che fertilizzato e impiantato in utero portò a gravidanza e alla nascita di un bambino (Burmeister et al., 2013).

#### *Reimpianto eterotopico*

Il reimpianto eterotopico è particolarmente indicato nel caso in cui, a causa di radioterapia pelvica o per la presenza di severe aderenze, non sia possibile effettuare il reimpianto ortotopico (Jeong et al., 2012).

Il primo caso di reimpianto eterotopico è stato riportato da Kim, nel 2004, che ha studiato la ripresa della funzionalità del tessuto ovarico crioconservato dopo

reimpianto eterotopico in una paziente di 37 anni affetta da carcinoma della cervice uterina.

Il tessuto ovarico, dopo scongelamento, è stato reimpiantato in due diversi siti: nello spazio tra il tessuto mammario e il muscolo pettorale e nello spazio tra la guaina rettale e il muscolo retto dell'addome.

Quattordici settimane dopo il reimpianto è stata osservata la ripresa della funzionalità steroidogenica, confermata sia dai livelli ormonali che dalla presenza di un follicolo in crescita nel tessuto reimpiantato a livello addominale. Il tessuto reimpiantato nel muscolo pettorale, invece, non ha mostrato invece alcun segnale di ripresa (Kim et al., 2004).

Nello stesso anno, Oktay riportò lo sviluppo di un embrione dopo reimpianto di tessuto scongelato sotto la cute dell'addome in una paziente di 36 anni affetta da carcinoma mammario.

Tre mesi dopo il reimpianto l'aumento dei livelli di estradiolo, la diminuzione di quelli di FSH e la presenza di follicoli in crescita dimostrarono la ripresa della funzionalità endocrina del tessuto. Dal tessuto furono recuperati 8 ovociti: 3 maturi e 5 furono maturati in vitro.

Due di quelli maturati in vitro si fecondarono e si sviluppò un embrione a 4 cellule che, trasferito in utero, non diede origine a una gravidanza (Oktay et al., 2004).

Nel 2005 Wolner-Hanssen riportò un caso di reimpianto eterotopico nell'avambraccio.

La paziente, 30 anni, era affetta da aplasia delle cellule della serie rossa e, dopo aver crioconservato il tessuto ovarico, era stata sottoposta a chemioterapia e a trapianto autologo di cellule staminali. Dopo il reimpianto, la paziente iniziò una terapia ormonale con FSH ed estradiolo, iniettato vicino al sito di reimpianto. Diciotto settimane dopo il reimpianto si osservò sviluppo follicolare; seguì un secondo ciclo di stimolazione ma senza effetti, suggerendo che il tessuto era ormai esaurito (Wolner-Hanssen et al., 2005).

Nel 2009 Kim descrisse il reimpianto eterotopico in 4 pazienti, di età compresa tra i 29 e i 38 anni (3 affette da carcinoma della cervice uterina e 1 affetta da carcinoma mammario).

I frammenti di tessuto ovarico scongelato furono reimpiantati tra il muscolo retto e la guaina rettale; il tessuto riprese la funzionalità endocrina, in tutte le pazienti, tra la 12<sup>a</sup> e la 20<sup>a</sup> settimana dopo il reimpianto; in tutti e 4 i casi, però, ebbe una breve durata. Tre pazienti si sottoposero nuovamente al reimpianto e ottennero una ripresa della funzionalità ovarica a lungo termine (Kim et al., 2009).

Nel 2011 Stern ha riportato il primo caso Australiano di reimpianto eterotopico di tessuto ovarico crioconservato. La paziente era affetta da linfoma non Hodgkin all'età di 16 anni e decise di sottoporsi a crioconservazione di tessuto ovarico dopo 6 cicli di chemioterapia.

Trascorsi 10 anni dalla crioconservazione il tessuto fu reimpiantato in due siti: la parete pelvica sinistra e la parete addominale sub peritoneale anteriore. Otto mesi e mezzo dopo il reimpianto, i livelli di FSH scesero, i sintomi menopausali cessarono e si osservò lo sviluppo follicolare in entrambi i siti di reimpianto e la paziente ebbe cicli mestruali spontanei. Diciassette mesi dopo il reimpianto il tessuto si esaurì e la paziente si sottopose a un secondo reimpianto e iniziò la terapia ormonale. Otto ovociti furono recuperati ma soltanto 1 sviluppò un embrione a due cellule che fu trasferito in utero, ma non si instaurò una gravidanza (Stern et al., 2011).

Nel 2012 Poirot riporta la prima induzione di pubertà in una bambina affetta da anemia falciforme. Nel novembre 2003 all'età di 10 anni, prima di iniziare la chemioterapia di condizionamento per il reimpianto allogenico di cellule staminali la paziente si sottopose a crioconservazione di tessuto ovarico. All'età di 13 (1.56 cm, 39 kg) non mostrando nessun segno di pubertà si decise di reimpiantare il tessuto. Nel gennaio del 2007 venne effettuato il reimpianto eterotopico nel sottocute della parete addominale al di sopra della futura zona pubica. Quattro mesi dopo il reimpianto comparvero i primi caratteri sessuali secondari e il menarca dopo 8 mesi. A due anni dal reimpianto le mestruazioni erano regolari e la paziente aveva raggiunto la statura definitiva di 1.72 cm per 52 kg (Poirot et al., 2012).

#### *Fattori limitanti lo sviluppo follicolare e la ripresa della funzionalità ovarica*

Nonostante i risultati ottenuti dalle procedure di reimpianto ortotopico ed eterotopico siano incoraggianti, ci sono ancora alcuni fattori che limitano il successo della procedura: età della paziente al momento della crioconservazione, trattamenti chemio

e radioterapici precedenti alla crioconservazione, protocollo di crioconservazione e i danni da ischemia che si instaurano nel tempo necessario alla rivascularizzazione del tessuto reimpiantato. Tali danni possono influenzare la sopravvivenza follicolare così come l'inizio della ripresa della funzione endocrina e la durata stessa dell'attività endocrina del reimpianto, tutti parametri correlati alla ripresa della funzionalità ovarica.

Uno dei principali problemi è rappresentato dalla rivascularizzazione del tessuto reimpiantato, infatti essendo il reimpianto avascolare, la perfusione del tessuto reimpiantato dipende dalla crescita di nuovi vasi (Demeestere et al., 2009).

Il processo di neovascolarizzazione dell'autotrapianto nel topo, è stato osservato in media 3 giorni dopo il reimpianto, il primo *step* di neovascolarizzazione è stato osservato entro le 48 ore, mentre un tessuto completamente rivascularizzato e funzionante dopo 1 settimana.

L'integrità strutturale e ultrastrutturale dello stroma durante questo periodo risulta essere essenziale per la sopravvivenza follicolare.

E' stato osservato, inoltre, che i follicoli primordiali possono tollerare uno stato d'ischemia non superiore alle 4 ore, mentre le cellule stromali appaiono molto più sensibili (Schmidt et al., 2003, Kim et al., 2004).

Il danno ischemico del tessuto reimpiantato può avere conseguenze sulla crescita dei follicoli, sul profilo ormonale e sul ripristino della fertilità - funzionalità del tessuto.

La deplezione follicolare stimata dal 25% al 95% (causata da danni alle cellule della granulosa e ad un aumentato fenomeno di apoptosi e/o necrosi), in base ai protocolli di crioconservazione impiegati, indotta dal danno ischemico è associata a una riduzione delle dimensioni del reimpianto e a un marcato aumento delle zone fibrotiche, influenzando lo stato ormonale e la ripresa della funzionalità ovarica (Nisolle et al., 2000).

In letteratura lo sviluppo follicolare e la ripresa della funzione ovarica sono riportate in media 5-6 mesi dopo il reimpianto, tenendo in considerazione che circa 120 giorni sono necessari per l'inizio della crescita follicolare e circa 85 giorni per raggiungere lo stato finale di maturazione, ovvero lo stato antrale (McGee et al., 2000).

La funzione ovarica dopo reimpianto può durare da pochi mesi fino a 5 anni (Lunardi et al., 2012).

Nonostante si ristabilisca il normale ciclo mestruale, si riscontrano alti valori basali di FSH dopo reimpianto e ciò riflette un ridotto pool follicolare (Donnez et al., 2005). Il persistere di alte concentrazioni di FSH possono contribuire negativamente sulla qualità ovocitaria e sulla maturazione follicolare.

#### *Ruolo di fattori esogeni*

Molteplici sono i tentativi riportati per cercare di ridurre il periodo ischemico sul tessuto, nel tentativo di salvaguardare la vitalità e la potenziale fertilità dopo il reimpianto.

Numerosi studi sono incentrati a dimostrare l'effetto benefico di agenti antiossidanti non enzimatici (vitamina E, acido ascorbico) fattori di crescita (*Fibroblast growth factor-FGF*, *Transforming growth factor-TGF*, *Vascular endothelial growth factor-VEGF*) e fattori ormonali (Gonadotropine). Gli esperimenti condotti su animali hanno riportato risultati positivi, tuttavia gli effetti sull'uomo devono ancora essere confermati (Demeestere et al., 2009).

Diversi studi hanno, inoltre, confermato che l'angiogenesi del tessuto reimpiantato può anche essere stimolata meccanicamente attivando i processi endogeni di formazione di nuovi vasi: per questo motivo molte procedure di reimpianto vengono effettuate mediante 2 *step* di laparoscopia: con un primo intervento si cerca di indurre la neovascolarizzazione del tessuto creando o una tasca peritoneale o incidendo longitudinalmente l'ovaio; circa una settimana dopo questo primo intervento si effettua un secondo intervento in cui si esegue il reimpianto di tessuto ovarico scongelato (Demeestere et al., 2009).

Studi condotti su animali confermano che la neovascolarizzazione di un tessuto, reimpiantato in un sito in cui sono attivi i processi infiammatori riparativi, avviene all'incirca 24 ore prima rispetto a un tessuto intatto (Israely et al., 2006).

#### *Sicurezza del reimpianto di tessuto ovarico*

Nonostante i risultati incoraggianti, il reimpianto di corticale ovarica presenta ancora alcune limitazioni importanti. Una di queste limitazioni da tenere in considerazione e scongiurare è la possibilità di reintrodurre cellule maligne nelle paziente. Infatti, idealmente il prelievo della biopsia ovarica con successiva crioconservazione, sono eseguite prima della somministrazione di chemioterapia o radioterapia, e il rischio di

coinvolgimento ovarico e ritrasmissione della malattia dopo autotrapianto in alcune patologie è veramente alto. In uno studio retrospettivo effettuato su campioni autoptici, il 22,4% dei malati di cancro di età inferiore ai 40 anni avevano metastasi ovariche (Kyono et al., 2010). La maggior parte delle metastasi che colpiscono le ovaie derivano da patologie in fasi avanzate del tratto gastrointestinale, cancro al seno o cancro endometriale (de Waal et al., 2009, Lee et al., 2009, Turan et al., 2006). Le 20 nascite riportate in letteratura derivano per la maggior parte da patologie maligne (linfoma di Hodgkin, cancro al seno, linfoma non-Hodgkin, sarcoma di Ewing, tumore neuro ectodermico) e ad oggi, non ci sono segnalazioni di recidiva di malattia dopo la procedura. Tuttavia la sicurezza del trapianto di tessuto ovarico in pazienti affette da patologie maligne dovrebbe essere testata e garantita in modo sistematico per tutti i tumori a basso-moderato rischio di coinvolgimento ovarico mediante i principali strumenti che sono attualmente disponibili per il rilevamento delle cellule tumorali disseminate, in particolare la classica istologia, immunohistochimica, PCR e gli esperimenti di xenotrapianto (Rosendahl et al., 2013).

## 2. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è stato quello di:

- ✓ ottimizzare la tecnica di congelamento lento e scongelamento rapido al fine di poter garantire una buona preservazione strutturale ed ultrastrutturale dei follicoli ovarici, delle cellule dello stroma e della componente vascolare dell'ovaio;
- ✓ confrontare le caratteristiche istologiche del tessuto scongelato prima del reimpianto a con le caratteristiche tessuto appena espantato;
- ✓ definire ed attuare la migliore procedura di reimpianto di tessuto ovarico crioconservato sulla base della storia clinica e delle aspettative di tre pazienti affette da:
  - carcinoma del colon retto,
  - linfoma di Hodgkin,
  - carcinoma mammario;
- ✓ definire la strategia migliore per minimizzare i tempi di neoangiogenesi dell'ovaio dopo reimpianto;
- ✓ individuare il miglior percorso di *follow-up* e analisi da effettuare per valutare la ripresa della funzionalità del reimpianto.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Pazienti incluse nello studio

In questo studio sono state incluse 3 pazienti affette da patologie di natura oncologica che si sono rivolte all'Unità Operativa Ginecologia e Fisiopatologia della Riproduzione Umana, Ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna, per la crioconservazione del tessuto ovarico.

#### 3.2 Prelievo di tessuto ovarico

La biopsia allargata per la crioconservazione è prelevata per via laparoscopica, in anestesia generale, quando possibile, da entrambe le ovaie.

Dopo l'induzione dell'anestesia generale viene insufflata nella cavità addominale (pneumoperitoneo), attraverso una piccola incisione (10 mm) in corrispondenza della cicatrice ombelicale, anidride carbonica sterile in modo da ottenere il sollevamento e lo scostamento della parete addominale dai visceri e dunque la visione laparoscopica. Una volta "gonfiata" (moderatamente 20 mm/Hg) la cavità addominale, si procede all'introduzione, per la stessa via, di una telecamera endoscopica. Attraverso piccole incisioni (5 mm) nella parete bassa e laterale dell'addome (quadranti inferiori laterali alla linea paramediana a livello dell'ombelico) s'introducono gli strumenti chirurgici necessari. La rimozione della biopsia allargata avviene sezionando l'ovaio lungo la linea di collegamento tra il legamento ovarico e l'infundibulo pelvico, in entrambe le ovaie (**Figura 3**). La quantità di tessuto ovarico rimossa è stabilita caso per caso valutando età, patologia, stima del rischio di ricaduta, terapia prevista, stima del rischio di esaurimento ovarico. Ogni frammento ovarico è messo in un *Endobag* e recuperato tramite la porta sovrapubica per evitare danni al tessuto. Se il sanguinamento dell'ovaio è profuso, l'emostasi è fatta con corrente bipolare, limitandone al massimo l'uso per evitare danni alla corteccia ovarica. Al termine dell'intervento chirurgico vengono rimossi gli strumenti e applicati punti sulle incisioni addominali (Paradisi et al., 2010).

Il tessuto è trattato seguendo i protocolli di crioconservazione, approvati dal Comitato Etico del Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna (Sperimentazione clinica 74/2001/0 approvata in data 13/02/2002 revisionato nel 2005).

Le biopsie sono subito immerse in una soluzione di mantenimento composta da *Dulbecco's phosphate buffered solution* (PBS, Gibco, Life Technologies LTD, Paisley, Scotland) addizionata con il 10% di siero umano scomplementato (proveniente da donatrici in età fertile, fornito dal Centro Trasfusionale dell'Ospedale S. Orsola-Malpighi) e mantenuto a 4°C per il trasporto in laboratorio.

Elimina la zona midollare della biopsia, la corticale caratterizzata dalla presenza del pool follicolare, è sezionata in sottili fettine (**Figura 4**):

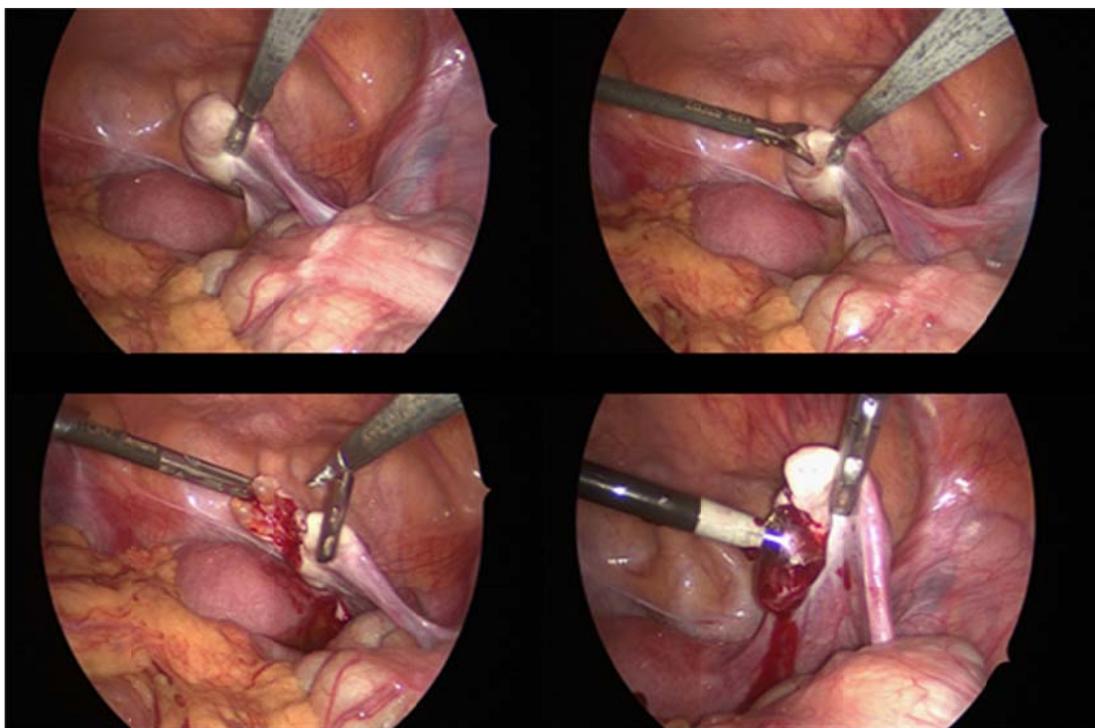
*Paziente 1*: 22 fettine per l'ovaio destro e 23 per l'ovaio sinistro, delle dimensioni medie di 1 cm x 2 mm x 2 mm;

*Paziente 2*: 17 fettine per l'ovaio destro e 11 per l'ovaio sinistro, delle dimensioni medie di 1,2 cm x 2 mm x 2 mm;

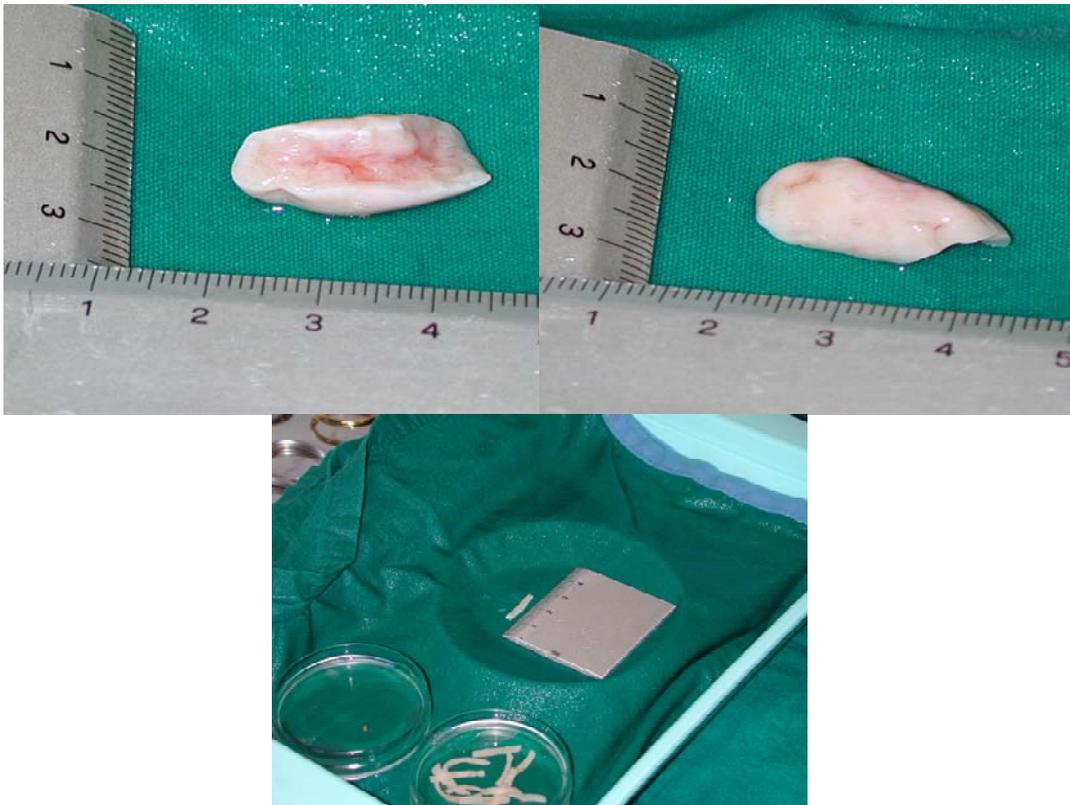
*Paziente 3*: 15 fettine per l'ovaio destro e 31 per l'ovaio sinistro, delle dimensioni medie di 1 cm x 2 mm x 2 mm;

Tutta la procedura è eseguita in condizioni di sterilità, a 4°C, sotto una cappa a lusso laminare verticale ed utilizzando materiale sterile.

Piccoli frammenti di 1 mm<sup>3</sup> di ciascun ovaio, sono immediatamente fissati per le analisi (controllo).



**Figura 3.** Procedura della biopsia allargata del tessuto ovarico.



**Figura 4.** Rimozione della zona midollare e sezionamento della zona corticale in fettine.

### **3.3 Protocollo di crioconservazione: congelamento lento/scongelamento rapido**

- Congelamento lento

Le fettine di corticale ovarica sono congelate utilizzando una soluzione composta da: saccarosio 0.175 M, crioprotettore non permeante (Sucrose, Sigma Aldrich, SrL, Milano) disciolto in PBS (PBS, Gibco, Life Technologies LTD, Paisley, Scotland); PROH 1.26 M, crioprotettore permeante (1,2 propanediolo, Fluka Chemica, Sigma Aldrich, SrL, Milano); 30% di siero umano scomplementato che funge da supporto proteico.

Le fettine di tessuto sono trasferite in *cryovials* (Intermed Nunc Cryotubes, Denmark) contenenti 1,8 ml di soluzione di congelamento; questi sono quindi trasferiti su un sistema rotante per 1 ora a 4°C per permettere al crioprotettore penetrante di entrare

all'interno del tessuto e sostituire le molecole d'acqua, mantenendo la struttura (e funzione) fisiologica nativa del materiale biologico.

Infine i *cryovials* sono inseriti a gruppi di tre su supporti metallici (stecche) e posti in un congelatore computerizzato programmabile (Planer Kryo 10/1,7 Series III, SAPIO Life, Milano).

La prima rampa di congelamento prevede l'abbassamento della temperatura da 0°C a -9°C alla velocità di 2°C/ min.

Raggiunti i -9°C, è previsto un *holding time* di 10 minuti in cui si stabilizza la temperatura; per permettere l'induzione manuale della formazione del primo nucleo di ghiaccio extracellulare (*seeding*) eseguita mediante contatto con una pinza pre-raffreddata in azoto liquido ed il *cryovial*, all'interfaccia fra la soluzione ed aria.

La temperatura viene nuovamente abbassata, dapprima lentamente ad una velocità di 0.3°C/min da -9°C a -40°C e poi rapidamente fino a -140°C alla velocità di 10°C/min.

A questo punto, dopo un periodo di stabilizzazione della temperatura di 10', i *cryovials* vengono estratti dal congelatore programmabile e immersi direttamente in azoto liquido (-196°C) per lo stoccaggio, all'interno di appositi contenitori e posti all'intero dei contenitori criogenici.

- Scongelo rapido

Dopo un periodo variabile di stoccaggio in azoto liquido, due campioni per ciascuna paziente, 1 ovaio destro e 1 ovaio sinistro, sono scongelati.

Il protocollo di scongelamento prevede che i *cryovials*, una volta estratti dall'azoto liquido, siano tenuti a temperatura ambiente per 30'' e poi immersi in acqua riscaldata a 37°C per 2'.

Il tessuto così scongelato è posto a 4°C, in soluzioni a molarità progressivamente decrescenti di crioprotettori con lo scopo di ottenere la completa reidratazione cellulare e la rimozione dei crioprotettori stessi.

SOLUZIONE 1:

5' in PBS + 0.76 M PROH + 0.175 M saccarosio + 30% siero umano

SOLUZIONE 2:

5' in PBS + 0.26 M PROH + 0.175 M saccarosio + 30% siero umano

SOLUZIONE 3:

10' in PBS + 0.175 M saccarosio + 30% siero umano

SOLUZIONE 4:

10' in PBS + 30% siero umano

Terminata l'incubazione in soluzione 4, i campioni di tessuto ovarico vengono fissati per le analisi dopo crioconservazione.

### | 3.4 Analisi in microscopia

#### *Allestimento dei preparati*

#### *Protocollo di inclusione in resina epossidica*

- I. Fissazione  
I campioni di tessuto ovarico da sottoporre all'analisi istologica sono fissati in paraformaldeide al 4% e mantenuti ad una temperatura di 4°C.
- II. Post-fissazione  
Rimozione del fissativo mediante 2 lavaggi di 10 minuti ciascuno con tampone fosfato 0,15 M a temperatura ambiente.  
Fissazione della frazione lipidica per 1 ora, in Tetrossido di osmio 1% in tampone fosfato 0,2 M, a temperatura ambiente.  
Rimozione dell'osmio mediante 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno con tampone fosfato 0,15 M, a temperatura ambiente.
- III. Disidratazione  
Passaggio graduale nella serie degli alcoli: 3 passaggi di 10 minuti ciascuno in alcool etilico a concentrazioni crescenti al 70%, 95% e 100%, a temperatura ambiente.  
Rimozione di eventuali residui di acqua e di alcoli mediante 2 lavaggi di 15 minuti in ossido di propilene a temperatura ambiente.
- IV. Infiltrazione e inclusione in resina epossidica  
Preparazione della resina: Araldite HY, indurente, (Araldite M, Hardener Fluka) e Araldite CY (araldite M, Fluka) in rapporto 1:1 e si aggiunge Araldite DY (2,4,6 tridimetilaminometilfenolo, DMP30 Fluka).  
La fase d'impregnazione in resina prevede il passaggio del tessuto in tre soluzioni costituite da resina e ossido di propilene in rapporto inversamente proporzionale:  
30 minuti in ossido di propilene e resina in rapporto 3:1 a 60°C,

30 minuti in ossido di propilene e resina in rapporto 1:1 a 60°C,  
overnight in ossido di propilene e resina in rapporto 1:3 a temperatura ambiente.  
Il giorno seguente i campioni di tessuto sono posti in contenitori cilindrici riempiti di resina assoluta e collocati in stufa a 60°C per 72 ore.

#### V. Sezionamento

I campioni sono sezionati con l'impiego di un Ultramicrotomo (ULTRACUT Reichert), il quale consente l'allestimento di materiale esaminabile al Microscopio Ottico (Olimpus) (sezioni semifini) e su retini o griglie (contenenti le sezioni fini o ultrafini) osservabili al Microscopio Elettronico a Trasmissione (Philips 400T).

L'operazione di sezionamento prevede 3 fasi:

Sgrossatura e "Trimming". Il campione è posizionato sul supporto porta-campione e si procede all'eliminazione della resina in eccesso attorno al campione.

Terminata la sgrassatura, il porta-campione è montato sul braccio rotante dell'ultramicrotomo e inizia il sezionamento.

Allestimento di sezioni semifini. Una volta che il campione è affiorato totalmente dalla resina si producono le sezioni semifini (1 m di spessore) che vengono raccolte delicatamente mediante una pinzetta a punta sottile su un vetrino portaoggetti e colorate. L'adesione di ciascuna sezione al vetrino portaoggetti è garantita da una goccia d'acqua distillata precedentemente posta su di esso.

Colorazione con Blu di Toluidina (Bio-Optica s.p.a., Milano)

Si elimina l'eccesso di acqua con carta assorbente,

si pone il colorante sulle sezioni e si adagia il vetrino su una piastra a 160°C,

si elimina l'eccesso di colorante sotto un getto di acqua di fonte e si asciuga il vetrino ponendolo su una piastra riscaldante a 90°C.

Allestimento delle sezioni fini. Il campione è bloccato nel porta-campione, poi osservandolo al binoculare, si effettua, con una lametta, un primo taglio orizzontale per eliminare la resina in eccesso posta sopra il campione, poi si effettuano quattro tagli inclinati di circa 60 gradi rispetto l'asse verticale. In questo modo si ottiene una piramide tronca con la faccia superiore a forma di trapezio regolare. In questo modo si elimina la resina in eccesso intorno alla zona di nostro interesse. Si esegue un'ulteriore sezionamento in modo da ottenere sezioni ultrafini di 60-70 nm di

spessore. Le sezioni ultrafini sono raccolte su griglie di osservazione ricoperte con *Formvar*, previo trattamento delle stesse con vapori di xilolo.

Le sezioni raccolte sulle griglie sono colorate mediante il passaggio in due diversi coloranti:

Immersione in acetato di uranile per 10 minuti a temperatura ambiente

Lavaggio con acqua distillata ed eliminazione dell'acqua in eccesso con carta assorbente

Immersione in citrato di piombo per 10 minuti a temperatura ambiente

Lavaggio con acqua distillata ed eliminazione dell'acqua in eccesso con carta assorbente.

Le griglie sono osservate al microscopio elettronico a trasmissione.

#### *Protocollo d'inclusione in paraffina*

##### I. Fissazione

I campioni di tessuto ovarico da sottoporre all'analisi istologica sono fissati in formalina al 2% e mantenuti a temperatura ambiente.

##### Processazione

I campioni tessutali fissati sono sciacquati dalla formalina e disidratati attraverso una scala di alcool etilici (in seguito alcol) a concentrazione progressivamente crescente. La processazione è eseguita dall'apparecchio TPC 15 Tissue Processing Center della Medite che è completamente automatico e il protocollo è completamente gestito da un programma informatico che è manipolato dall'operatore in base alle proprie esigenze. Le capsule contenenti il materiale da processare sono contenute in un cestino di metallo che è spostato da un braccio meccanico; durante le incubazioni l'apparecchio crea un *vacuum* così da favorire la penetrazione dei liquidi all'interno dei tessuti.

I tempi di processazione variano in base alla dimensione e al tipo di struttura dei tessuti istologici.

##### II. Disidratazione

La scala di alcool consiste progressivamente nel passaggio dei campioni in alcool 70, 80, 95 e 100%.

##### III. Chiarificazione

Passaggio dei campioni in xilolo

IV. Impregnazione

I tessuti passano nella paraffina liquida a 60°C

V. Inclusione

Il processo d'inclusione dei tessuti nella paraffina è eseguito tramite un sistema d'inclusione TES 99 (Medita). Le capsule con i campioni processati sono posizionate nel termostato, poi la capsula è spostata sulla piastra di lavoro e aperta; il campione tessutale viene trasferito e orientato all'interno della capsula d'inclusione che viene riempita con la paraffina fusa. Successivamente la capsula viene trasferita sull'unità raffreddante. Una volta raffreddati e induriti i blocchi di paraffina contenenti il tessuto sono tolti dalla capsula d'inclusione.

VI. Taglio

L'esecuzione del taglio del tessuto avviene tramite microtomo incluso in paraffina. Il blocco contenente il tessuto è fissato sul supporto e tagliato in sezioni da 5 µm. La sezione ottenuta messa nel bagnomaria con acqua a una temperatura di 40°-45°C e successivamente il taglio viene adagiato su un vetrino.

VII. Colorazioni

Sparaffinatura: 15' in xilene I, 15' in xilene II

Reidratazione: 5'' in etanolo 100% I, 5'' in etanolo 100° II, 5'' in etanolo 95°, 3'' in etanolo 90°, 3'' in etanolo 80°, 2 lavaggi da 3'' in acqua distillata. Porre i vetrini in PBS.

Si elimina l'acqua in eccesso sul vetrino con carta assorbente.

*Protocollo colorazione per la TUNEL assay*

Per la colorazione di TUNEL si utilizzano campioni inclusi in paraffina, sezionati, sparaffinati e reidratati.

Digestione con preteinasasi. Permeabilizzazione del tessuto con 20 µg / ml Proteinasi K (Gibco BRL) in 10 mM Tris 7,5 e 5 mM di EDTA. Incubare 30' a 37°C. Si elimina l'acqua in eccesso sul vetrino con carta assorbente.

Controllo positivo. Si mette a incubare per 10' la sezione di controllo a 37°C con 1500U/ml DNase in 50 mM Tris ph 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA.

Colorazione di TUNEL. 50  $\mu$ l di soluzione TUNEL mix su ogni sezione per 1 ora a 37°C al buio. Si elimina l'acqua in eccesso sul vetrino con carta assorbente.

Al termine della colorazione si pone sulla sezione il montante il copri-oggetto e si pongono le sezioni a incubare a 37°C per 24 ore.

*Protocollo colorazione dei campioni per la microscopia laser scanning confocale*

I campioni che sono stati sottoposti all'analisi di microscopia confocale subiscono una triplice colorazione con *probes* fluorescenti.

*Colorazioni per l'individuazione dei mitocondri attivi e delle specie reattive dell'ossigeno*

La prima colorazione è stata effettuata lavando il tessuto ovarico prima in PBS/siero umano (10%) per 3 lavaggi, e incubato in 400  $\mu$ l dello stesso medium contenente 280 nM di MitoTracker Orange CMTM Ros (Molecular Probes, Oregon, USA M-7510) a 37°C 6% di CO<sub>2</sub> per 45'. Questo fluoroforo permea attraverso le membrane ed entra nei mitocondri in attiva respirazione e, tramite un gruppo cloro metilico, reagisce e forma dei coniugati fluorescenti con i gruppi tiolici delle proteine presenti nel mitocondrio (Poot et al.,1996).

Successivamente il tessuto è stato sottoposto ad ulteriori lavaggi in PBS/siero umano (1%) per rimuovere il colorante in eccesso e poi incubati in una soluzione 10  $\mu$ M di DCHFDA in PBS/siero umano (1%) a 37°C 6% di CO<sub>2</sub> per 45'. Il DCHFDA è un fluoroforo che entra nella cellula per diffusione semplice attraverso la membrana e successivamente viene idrolizzato dalle esterasi intracellulari, trasformandosi così nella sua forma deacetilata che non è più in grado di attraversare il *bilayer* fosfolipidico delle membrane e rimane quindi intrappolata all'interno della cellula. Il DCFH (2',7'-diclorodididrofluoresceina) reagisce con i ROS intracellulari, in particolar modo con il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), riducendo l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ad H<sub>2</sub>O ed ossidandosi a DCF (2',7'-diclorofluoresceina), un composto altamente fluorescente. Dopo 45' d'incubazione il tessuto è lavato in PBS e poi trasferito overnight in paraformaldeide al 2%.

Il tessuto una volta fissato è processato per l'inclusione in paraffina, sparaffinato e sezionato.

A questo punto si procede con la terza colorazione. Le fette di tessuto sono trattate con Hoechst 33258, un fluoroforo che si lega al DNA, con particolare affinità per adenina e timina e libera un segnale di fluorescenza blu a 420 nm permettendo così la valutazione dei nuclei.

Il colorante si prepara sciogliendo 1 mg di Hoechst 33258 in 1 ml di H<sub>2</sub>O distillata e diluendo poi in una soluzione di glicerolo (G-2025 Sigma) e PBS in rapporto 3:1, per raggiungere una concentrazione finale di 2,5 µg/ml.

Per l'acquisizione del segnale emesso dal DCHFDA è stato utilizzato un raggio laser Argon Ions 488 con filtri B2-A (eccitazione a 495 nm ed emissione a 519 nm), mentre il segnale del MitoTracker Orange CMTM Ros è stato acquisito mediante un laser Helium/Neon a 543 nm e filtro G-2 A (eccitazione a 547 nm e ed emissione a 572 nm).

#### *Parametri di valutazione*

##### ✓ Analisi morfologica strutturale

Tutti i campioni sono stati analizzati “in cieco”, mediante tecnica di microscopia ottica (Nikon Instruments, Inc) ad alta risoluzione su sezioni semifini dello spessore di 1µm. Seguendo i criteri di Fabbri et al. 2010. Per ogni sezione sono valutati il grado di preservazione stromale, il numero, la preservazione e lo stadio di sviluppo dei follicoli.

I follicoli sono stati contati e classificati come segue: primordiali (resting), primari, secondari, preantrali e antrali (growing) (Gougeon 1996). Il grado di preservazione follicolare è stato determinato, in base alla presenza di: vacuolizzazioni a carico del citoplasma, del nucleo o delle cellule della granulosa, scollamento dell'ovocita e delle cellule della granulosa, chiarificazione o inscurimento del citoplasma; compattamento della cromatina nei nuclei delle cellule della granulosa; presenza di follicoli collassati e/o dismorfici.

Il grado di preservazione dello stroma è stato valutato in base alla presenza di segni di apoptosi e in base alla cellularità del campione; le cellule stromali in apoptosi sono

caratterizzate da nucleo con cromatina addensata, vacuolizzazione citoplasmatica o nucleare e perdita del citoplasma.

I vasi sanguigni sono stati considerati intatti e ben preservati quando la parete vascolare si presentava rivestita da uno strato continuo di cellule endoteliali con citoplasma sottile e nucleo appiattito o ovoidale; sono stati considerati danneggiati i vasi nei quali si osservava vacuolizzazione e rigonfiamento del citoplasma endoteliale, addensamento della cromatina nucleare e sfaldamento intraluminale endoteliale; la presenza di ialinosi parietale intesa come manicotto acellulato di materiale eosinofilo periendoteliale è stata, come già riportato, considerato un effetto avverso di pregressa chemioterapia.

✓ Analisi dell'induzione dell'apoptosi

I follicoli osservati al microscopio ottico (Nikon Instruments, Inc), sono stati considerati apoptotici quando mostravano più di due cellule della granulosa o se il nucleo dell'ovocita risultava TUNEL positivo. La percentuale di cellule apoptotiche è stata analizzata mediante l'utilizzo dell'Image Pro-Plus software. I nuclei erano considerati positivi se mostravano una colorazione marrone. Per stabilire la percentuale di apoptosi delle cellule stromali il numero di nuclei apoptotici e vitali è stato calcolato prendendo in considerazione un 100- $\mu\text{m}^2$  quadrato (randomizzati in varie sezioni), ricalcolato tre volte, e mediato il valore. Successivamente la percentuale di cellule apoptotiche è stata calcolata come segue, il numero di cellule apoptotiche / numero totale di cellule x 100.

I vasi sono stati considerati apoptotici quando mostravano un numero  $\geq 50\%$  di cellule endoteliali positive.

✓ Analisi morfologica ultrastrutturale

Questa tipologia di valutazione morfologica è stata validata ed estesa mediante l'osservazione in microscopia elettronica a trasmissione (Philips 410 T transmission electron microscope at 80kV), ove sono stati presi in considerazione i seguenti caratteri morfologici (Fabbri et al., 2010).

### Follicoli

- stato di preservazione dell'ovocita: disegno cromatinico nucleare, grado ed estensione della vacuolizzazione citoplasmatica e nucleare, localizzazione, forma e numero dei mitocondri, inoltre, aspetto delle creste e densità della matrice mitocondriale,
- stato di preservazione delle cellule della granulosa: adesione all'ovocita, grado ed estensione della vacuolizzazione citoplasmatica e nucleare, dove visibili stato degli organelli citoplasmatici.

### Stroma

- assenza o presenza di edema interstiziale,
- stato di preservazione della componente cellulare: estensione della vacuolizzazione e frammentazione citoplasmatica, stato della cromatina nucleare e dove visibili, stato degli organelli citoplasmatici.

### Vasi sanguigni

- endotelio continuo con citoplasma di aspetto compatto e privo di vacuolizzazione mitocondriale; *tight junctions* competenti; membrana basale continua di spessore contenuto e priva di fenomeni di reticolazione;
- anomalie vascolari: endotelio vacuolizzato e con citoplasma chiarificato; rottura delle giunzioni e distacco di porzioni più o meno estese del citoplasma fino a completa desquamazione endoteliale, ispessimento della membrana basale e presenza di materiale amorfo, non strutturato, membranoso ialino.

### ✓ Analisi confocale

Un'ulteriore validazione del dato riscontrato è stata ricercata mediante osservazione del tessuto in microscopia laser scanning confocale (C1/TE2000-U Nikon).

### Follicoli

Sui follicoli si è eseguita un'analisi di tipo qualitativo andando a monitorare i seguenti parametri, ad un ingrandimento di 600x in olio ad immersione:

- Morfologia nucleare,
- Distribuzione mitocondriale,
- Localizzazione intracellulare dei ROS,
- Colocalizzazione dei due segnali di fluorescenza.

La morfologia nucleare è stata valutata mediante osservazione al microscopio a fluorescenza Nikon E 600 con filtro B-2 A (eccitazione a 330-380 nm, emissione a 420 nm), previo trattamento con Hoechst 33258; ciò ha consentito non solo l'individuazione dell'integrità nucleare delle cellule follicolari, ma anche la stadiazione dei follicoli, descritta sulla base dei criteri di Gougeon 1996.

L'analisi qualitativa dei ROS permette di evidenziare la presenza/assenza di specie reattive dell'ossigeno nei follicoli, nonché la colocalizzazione del segnale relativo allo stress ossidativo con quello prodotto dai mitocondri.

#### Stroma

Per quanto riguarda lo stroma si è eseguita una valutazione di tipo qualitativa in cui abbiamo preso in considerazione i seguenti parametri:

- Attività mitocondriale,
- Misurazione diretta dei livelli di ROS intracellulari.

Tramite il software di analisi di immagine EZ-C1 per microscopio confocale Nikon C1, è stata acquisita l'immagine del campione ad ingrandimento 4x, in modo da visualizzare l'intero pezzo, su cui sono stati quantificati i segnali di fluorescenza del MitoTracker Orange CMTM Ros e della DCHFDA. Le valutazioni sono state effettuate sul piano equatoriale di ciascun vetrino analizzato e i parametri relativi all'intensità di fluorescenza (apertura del laser) sono stati mantenuti costanti per tutte le misurazioni. L'intensità di fluorescenza è stata registrata in 5 regioni di interesse (ROI) per vetrino, di grandezza pari a  $50000\mu\text{m}^2$  ciascuna. L'intensità di fluorescenza misurata è stata registrata e rapportata alla scala convenzionale di unità di pixel (0-255).

#### Vasi sanguigni

Per quanto riguarda la componente vascolare si è eseguita una valutazione di tipo qualitativa in cui abbiamo preso in considerazione i seguenti parametri:

- Attività mitocondriale,
- Misurazione diretta dei livelli di ROS intracellulari.

#### *Analisi statistica*

La valutazione statistica è stata effettuata mediante l'impiego di Graph-Pad Prism (version 4; [www.grahpad.com](http://www.grahpad.com)). Il *t*-test è stato utilizzato per determinare la relazione statistica tra le differenze morfologiche riscontrate all'analisi isotologica e confocale e analizzare i dati relativi ai livelli di stress ossidativo e i dati riguardanti l'attività mitocondriale. La differenza nelle percentuali di induzione di apoptosi per follicoli, cellule stromali e vasi è stata valutata mediante test del Chi-quadrato. Nel caso in cui la dimensione del campione analizzato fosse piccola è stato utilizzato il test esatto di Fisher's. Valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

### **3.5 Analisi di laboratorio: dosaggi ormonali**

Il prelievo ematico è effettuato al momento del ricovero prima della crioconservazione, prima del reimpianto e durante tutto il periodo del *follow-up*. Il sangue periferico è stato prelevato tra le ore 08.00 e le 09.00, dopo il digiuno notturno, lo stesso giorno sono stati eseguiti gli esami ecografici e Doppler.

Le determinazioni sieriche sono eseguite dal Laboratorio Centralizzato dell'Ospedale S.Orsola-Malpighi. Sono stati presi in considerazione diversi parametri ormonali (**Tabella 2**).

<b>Esame</b>	<b>Metodica</b>	<b>U.M.</b>	<b>Valori Riferimento</b>
<b>FSH</b>	ECLIA cv 5%	mIU/mL	F.foll 3.5-12 F.lut 1.7-7.7 Picco 4.7-21.5 Menopausa 25.8-135
<b>LH</b>	ECLIA cv 5%	mIU/mL	F.foll 2.4-12.5 F.lut 1.5-9.8 Picco 14-95.6 Menopausa 10.4-60
<b>E2</b>	ECLIA cv 8%	pg/mL	F.foll 12.5-165 F.lut 27.0-205 Picco 88-490 Menopausa 12-45
<b>E1</b>	ECLIA cv 8%	pg/mL	F.foll 40-140 F.lut 50-120 Picco 60-230 Menopausa 15-100
<b>P</b>	ECLIA cv 5%	ng/mL	3-25
<b>PRL</b>	ECLIA cv 8%	ng/mL	F.foll 0.2-0.8 F.lut 1.8-25 Menopausa 0.1-0.8
<b>17-OHP</b>	ECLIA cv 7%	ng/mL	F.foll 15-100 F.lut 7-310 Menopausa 8-130
<b>T</b>	ECLIA cv 7%	ng/mL	0.2-0.8
<b>IB</b>	ELISA	pg/mL	Età fertile 7-240 Post menopausa <7

**Tabella 2.** Parametri ormonali sierici analizzati.

### 3.6 Analisi strumentali: Ecografia bidimensionale ed color Doppler

Tutte le analisi sono state eseguite tra le ore 11 e 12 in coincidenza dei dosaggi ormonali, a vescica svuotata e in un ambiente tranquillo e confortevole.

Reimpianto ortotopico

La sonda ecografica RIC5-9H (Voluson 730 Expert ecografia System; GE Healthcare Ultrasound, Zipf, Austria), avvolta da un involucro sterile, è introdotta in vagina e angolata diversamente permettendo il posizionamento della sonda a diretto contatto con gli organi pelvici consentendo di acquisire informazioni su forma, dimensioni e volumi di utero, ovaie e follicoli (Tabella:Ecografia).

Inoltre l'apparato riproduttore è stato valutato mediante l'impiego di un multi frequenza-color Doppler (Voluson 730 Expert ecografia Doppler Color System), per la misurazione del flusso Doppler dei principali vasi ovarici e intra-ovarici. Gli indici vascolari ricavati dall'analisi (Tabella:dopplerflussimetria) sono stati interpolati utilizzando il software VOCAL (Virtual Organ Computer-Aided Analysis).

Reimpianto etero topico

In seguito all'analisi con sonda trasvaginale eseguita come per il reimpianto eterotopico è stata eseguita un'ulteriore analisi. La sonda (RSP-16 multi-frequenza trasduttore a matrice lineare 4D, Voluson 730 Expert ecografia System) è stata posta su entrambi i lati della zona sovrapubica in prossimità dell'impiantato del tessuto ovarico.

Ecografia	Dopplerflussimetria ovaio destro/sinistro
Volume ovaio destro/sinistro Lunghezza x larghezza x profondità x 0.533	Arteria uterina PI*
N° e dimensione follicoli antrali ovaio destro/sinistro	Arteria ovarica PI*
Dimensioni utero	Arteria stromale PI*
Spessore endometrio	Arteria perifollicolare PI*
	VFI indice di riempimento venoso
	VI indice di vascolarizzazione
	FI indice di flusso

**Tabella 3.** Parametri analizzati mediante ecografia transvaginale bidimensionale ed color Doppler

\*Per ogni esame, è stato ottenuto il valore medio delle tre forme d'onda consecutive.

### 3.7 Storia clinica

#### *Paziente 1*

Nel Dicembre 2003, all'età di 23 anni, la paziente affetta da adenocarcinoma del colon retto fu sottoposta ad asportazione chirurgica del tumore e a Febbraio 2004, ha iniziato la chemioterapia secondo il protocollo De Gramont' (di5-fluoro uracile e acido folinico). Terminati i primi tre cicli, la paziente si è sottoposta a crioconservazione di tessuto ovarico. In seguito la paziente ha completato il programma di terapie con altri nove cicli di chemioterapia e radioterapia alla pelvi posteriore (45 Gy) combinata con radioterapia *boost* (4,5 Gy) in corrispondenza della sede del tumore.

Al termine dei trattamenti antitumorali (Agosto 2004) la paziente è diventata amenorroica. Lo stato di fallimento ovarico precoce è stato confermato dall'esame ecografico, che rivelava ovaia di piccole dimensioni e senza segni funzionali, dagli elevati livelli sierici di FSH e LH rispettivamente di 226 mIU/mL e 47 mIU/mL, nonché dalla comparsa degli effetti collaterali dello stato menopausale.

E' stata quindi prescritta alla paziente una terapia ormonale sostitutiva (Yasminelle) che è stata interrotta nel 2010 per la diagnosi di un fibroadenoma alla mammella sinistra. Dopo essersi sottoposta a nodulectomia della mammella ed essere stata dichiarata in remissione completa dalla malattia di base la paziente si è rivolta alla nostra Unità Operativa per richiedere il reimpianto del tessuto ovarico. Alla paziente viene nuovamente prescritta la terapia ormonale sostitutiva (Femseven + Dufaston) per stabilizzare i livelli di gonadotropine. Considerando quindi le richieste della paziente, è stato deciso di proporle il reimpianto ortotopico delle fettine di corticale in precedenza crioconservate.

In procinto del reimpianto la paziente, eseguiti tutti i controlli, ha sospeso la terapia ormonale sostitutiva (FSH e LH rispettivamente di 134,6 mIU/mL e 62,9 mIU/mL) e l'ultima ecografia transvaginale mostrava ovaie di dimensioni ridotte (volume ovaio destro: 0,381 cm<sup>3</sup>; volume ovaio sinistro: 0,282 cm<sup>3</sup>) e atrofiche, con assenza di strutture follicolari. Non si visualizzava vascolarizzazione endo-ovarica (AUIPI=1.93; ov dx AOPI=2.76, ASPI=nv; ov sx AOPI=2.63, ASPI=nv). A Dicembre 2011, 7 anni

dopo la crioconservazione, è stato effettuato, in laparoscopia, il reimpianto ortotopico del tessuto crioconservato.

### *Paziente 2*

Nel 2000, all'età di 29 anni, la paziente affetta da linfoma di Hodgkin IV stadio, a livello sovraclavare e in sede addominale, variante a cellularità mista, si sottopose a crioconservazione del tessuto ovarico.

In seguito la paziente ha iniziato il trattamento chemioterapico che prevedeva 6 cicli di ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina) e 5 cicli di radioterapia in regione sopra- diaframmatica e addominale per un totale di 156 Gy. Inoltre la paziente si sottopose a laparotomia per l'asportazione di linfonodi addominali e biopsie epatiche di controllo.

Dopo i suddetti trattamenti, la paziente ha avuto cicli mestruali irregolari alternati ad amenorrea; durante il periodo di irregolarità mestruale, nonostante non fossero passati i cinque canonici anni dal termine dei trattamenti, la paziente ha avuto due gravidanze spontanee portate a termine con la nascita di due bambini sani, uno nel 2003 e uno nel 2005.

Dal 2009 la paziente non ha più avuto cicli mestruali e manifestava severi sintomi menopausali (osteopenia e vampate di calore) confermati da elevati di FSH (123.5 mIU/ml) e LH (46.2 mIU/mL).

Nell'agosto 2011, la paziente richiese il reimpianto del tessuto ovarico crioconservato.

Essendo la paziente interessata al ripristino della sola funzione steroidogenica, in quanto già madre di due figli e accertata la difficoltà di entrare nella cavità pelvica a causa della precedente laparotomia, le è stato proposto di effettuare il reimpianto eterotopico nel sottocute sovrapubico.

Gli esami ormonali pre reimpianto hanno mostrato FSH 113.5 mIU/mL e LH 40.1 mIU/mL e l'ecografia transvaginale ha evidenziato ovaie di dimensioni ridotte (volume ovaio destro: 1,58 cm<sup>3</sup>; volume ovaio sinistro: 2,18 cm<sup>3</sup>), senza segni funzionali. Non si visualizzava vascolarizzazione endo-ovarica (AUPI=2.79; ov dx AOPI=3.13, ASPI=nv; ov sx AOPI=5.12, ASPI=nv).

Nel Marzo 2012, 12 anni dopo la crioconservazione, è stato effettuato il reimpianto del tessuto ovarico.

### *Paziente 3*

Nel settembre 2005 all'età di 34 anni alla paziente fu diagnosticato un carcinoma mammario lobulare infiltrante e un mese dopo si sottopose a quadrantectomia sinistra. A distanza di pochi giorni, prima di intraprendere la chemioterapia prevista Adriamicina e Ciclofosfamide per 4 cicli, la paziente si è sottoposta a laparoscopia operativa per la crioconservazione del tessuto ovarico. Inoltre, terminata la chemioterapia, la paziente si è sottoposta a trattamento radioterapico con *boost* (50+10 Gy) per circa 1 mese ed ha assunto Enantone e Tamoxifene per i successivi due anni. Nel Gennaio del 2009 la paziente ebbe la prima mestruazione dopo la fine delle terapie e in seguito ebbe cicli mestruali irregolari alternati all'amenorrea fino alla menopausa nel 2011.

Ad un esame ecografico le ovaie apparivano atrofiche (volume ovaio destro: 0,55 cm<sup>3</sup>; volume ovaio sinistro: 0,44 cm<sup>3</sup>) senza segni funzionali e livelli elevati di FSH (86.1 mIU/mL) e LH (46.3 mIU/mL). Non si visualizzava vascolarizzazione endo-ovarica (AUPI=1.79; ov dx AOPI=2.13, ASPI=nv; ov sx AOPI=2.18, ASPI=nv).

Nel settembre 2011, la paziente richiese il reimpianto del tessuto ovarico crioconservato. Considerando quindi le richieste della paziente, è stato deciso di proporle il reimpianto ortotopico delle fettine di corticale in precedenza crioconservate e nel giugno 2012 la paziente si sottopose al reimpianto.

### **3.8 Procedura di reimpianto autologo di corticale ovarica**

Qualche settimana prima del reimpianto sono state scongelate due fettine di corticale ovarica (una per ogni ovaio) al fine di valutare: la qualità delle cellule stromali, la qualità e la densità follicolare, la qualità della componente vascolare, l'assenza di cellule maligne.

#### *Reimpianto ortotopico (Paziente 1 e 3)*

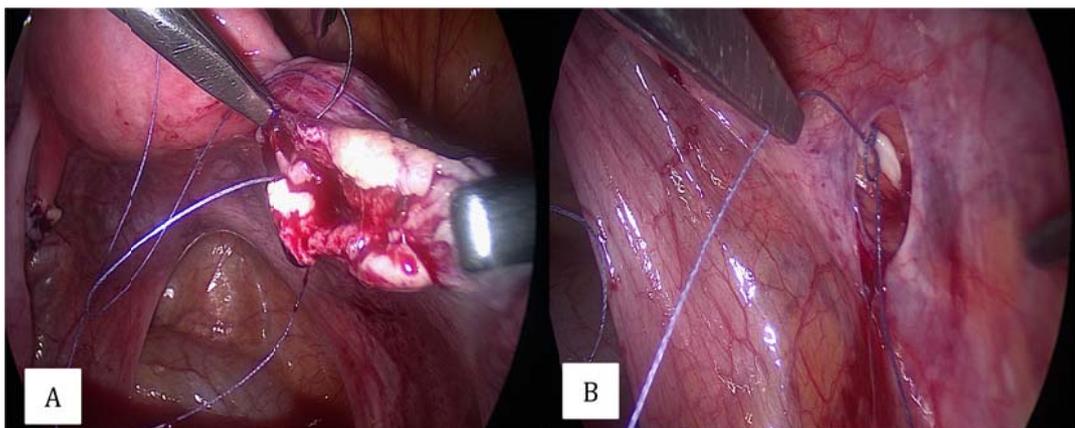
Il giorno del reimpianto sono state scongelate 20 fettine (Paziente 1) e 46 fettine (Paziente 3) di tessuto ovarico secondo il protocollo di scongelamento rapido. Il

numero è stato stabilito sia in base alla densità follicolare che alla grandezza del sito scelto per il reimpianto.

Un filo di sutura (Vicryl 4-0) è stato fatto passare attraverso due o tre fettine di tessuto e immediatamente trasportato in sala operatoria in un contenitore con soluzione di mantenimento, composta da PBS e 10% di siero umano, alla temperatura di 4°C.

Il reimpianto è stato eseguito effettuando 4 porte di laparoscopia (2 laterali, 1 sovrapubica e 1 sovraombelicale). La superficie dell'ovaio è stata incisa longitudinalmente per circa 1 cm ed è stata creata una tasca nel parenchima ovarico (Figura). Per la Paziente 1 sono state inserite 5 fettine di tessuto per ogni ovaio, mentre per la Paziente 3 sono state inserite 30 fettine nell'ovaio sinistro e 13 nell'ovaio destro. Il filo di sutura contenente le fettine di tessuto è stato utilizzato anche per richiudere la tasca.

E' stata inoltre creata una tasca peritoneale di circa 1,5 cm di lunghezza nella fossetta ovarica in prossimità dei vasi ovarici e delle fimbrie. In particolare per la paziente 1 sono state create 2 tasche, una sul lato destro e una sul sinistro, in ciascuna delle quali sono state inserite 5 fettine di corticale ovarica. Le tasche sono state richiuse con filo di sutura. Per la paziente 3 è stata creata 1 sola tasca sul lato destro in cui sono state inserite 3 fettine di corticale ovarica.



**Figura 5.** A. Sito di reimpianto sull'ovaio residuo. B. Sito di reimpianto nella tasca peritoneale.

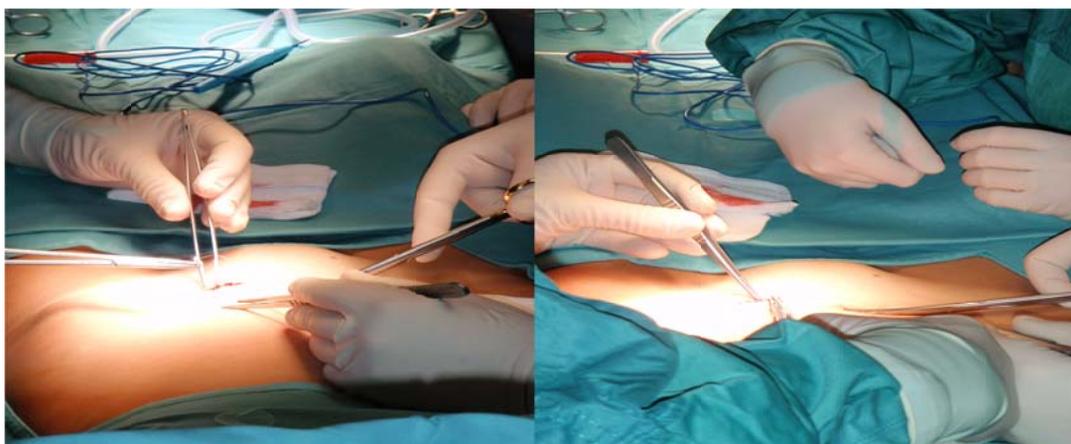
### *Reimpianto eterotopico (Paziente 2)*

Il giorno del reimpianto sono state scongelate 10 fettine di tessuto ovarico secondo il protocollo di scongelamento rapido; il numero è stato stabilito sia in base alla densità follicolare che alla grandezza del sito scelto per il reimpianto.

Le fettine sono state poste in un contenitore sterile con soluzione di mantenimento, costituita da PBS addizionato con 10% di siero umano, alla temperatura di 4°C e trasportate immediatamente in sala operatoria.

Il reimpianto è stato effettuato nel sottocute sovrapubico; è stata effettuata una incisione trasversale, sia a destra che a sinistra, di circa 2 cm e sono state create due tasche; in ognuna delle quali sono stati reintrodotti 5 frammenti di corticale ovarica.

I frammenti, a differenza del reimpianto ortotopico, non sono stati uniti insieme da un filo di sutura, ma sono stati posizionati gentilmente all'interno della tasca (**Figura 6**).



**Figura 6.** Sito di reimpianto nel sottocute sovrapubico.

### *Follow-up*

Una volta effettuato il reimpianto le pazienti sono state monitorate ogni 3 settimane presso l'Unità Operativa con: prelievo ematico per valutare i livelli ormonali, ecografia bidimensionale e color-doppler, per valutare lo sviluppo follicolare e lo stato di neovascolarizzazione del tessuto reimpiantato.

In particolare per la Paziente 1 alla comparsa del primo ciclo mestruale gli esami ormonali sono stati ripetuti ogni 7 giorni.

Il monitoraggio della funzionalità del tessuto è ancora in corso per tutte e tre le pazienti.

## 4. RISULTATI

### 4.1 Microscopia ottica

L'analisi istologica effettuata, ha permesso di elaborare considerazioni sovrapponibili per tutte e tre le pazienti.

L'osservazione al microscopio ottico del tessuto fresco ha evidenziato stroma cellulare compatto con nuclei a regolare disegno cromatinico; follicoli, principalmente allo stadio primordiale (83%), con cellule della granulosa appiattite e adese all'ovocita. Il citoplasma dell'ovocita si presentava regolarmente distribuito, finemente granulare e popolato di mitocondri rotondeggianti in zona perinucleare; il nucleo, dove visibile, mostrava regolare disegno cromatinico (89% follicoli ben preservati vs 11% follicoli atresici,  $P=0$ ).

Densità follicolare:

*Paziente 1:* 3 follicoli per  $\text{mm}^2$  di superficie analizzata

*Paziente 2:* 8 follicoli per  $\text{mm}^2$  di superficie analizzata

*Paziente 3:* 1 follicolo per  $\text{mm}^2$  di superficie analizzata.

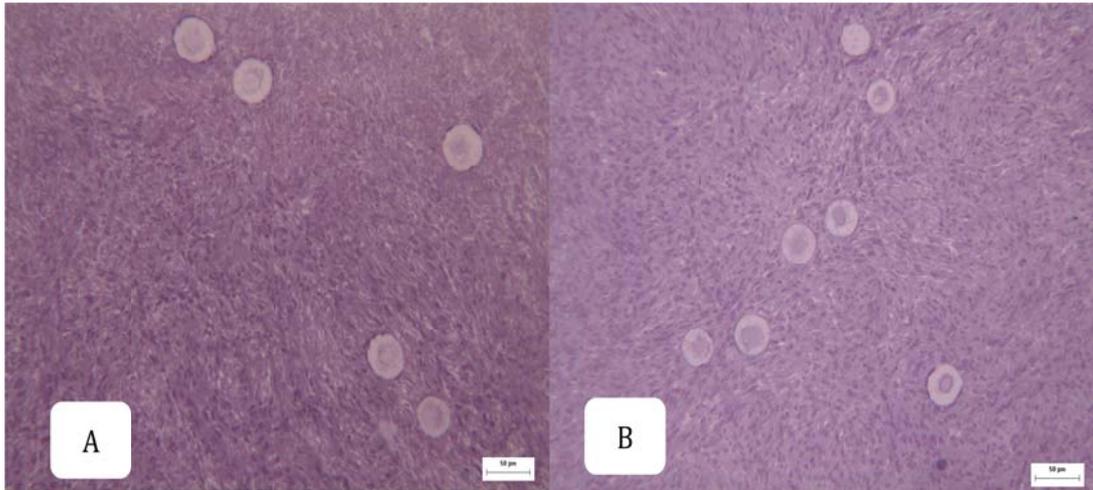
L'osservazione al microscopio ottico del tessuto scongelato ha mostrato una componente stromale con caratteristiche morfologiche sovrapponibili a quelle del campione fresco ovvero compatto e con nuclei a regolare disegno cromatinico .

I follicoli in prevalenza primordiali (79%) presentavano una morfologia pressoché paragonabile a quella osservata nel tessuto fresco; nucleo rotondeggiante, cellule della granulosa adese all'ovocita, anche se il citoplasma dell'ovocita appariva tuttavia leggermente chiarificato, apparendo in alcune parti come "svuotato" (78% follicoli ben preservati vs 22% follicoli atresici,  $P=0$ ).

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative in nessun parametro analizzato.

La componente vascolare visto il piccolo calibro dei lumi non ha consentito una valutazione sullo stato di preservazione.

L'analisi istologica, sia per il campione fresco sia per il campione scongelato non ha rilevato la presenza di cellule maligne nel tessuto.



**Figura 7.** A. Cluster di follicoli primordiali ben preservati di corticale appena prelevata. B Cluster di follicoli primordiali ben preservati di corticale criopreservata.

#### **4.2 TUNEL assay**

L'analisi dell'indici di apoptosi effettuata, ha permesso di elaborare considerazioni sovrapponibili per tutte e tre le pazienti.

L'analisi della frammentazione del DNA, ha rilevato nei campioni freschi il 22% di follicoli positivi primordiali (distribuzione positività:12.5% ovociti, 2% delle cellule della granulosa, 7.5% ovociti+cellule della granulosa) e il 23.1% di follicoli positivi primari (distribuzione positività:11.5% ovociti, 2% delle cellule della granulosa, 9.6% ovociti+cellule della granulosa). Le cellule stromali hanno mostrato un grado di apoptosi nei campioni freschi pari al 15% e del 25% nei campioni criopreservati. I vasi hanno un mostrato un grado di apoptosi praticamente nullo sia nei campioni freschi sia in quelli criopreservati (0.5% vs 0.9%).

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative in nessun parametro analizzato.

**Figura 8.** A. Controllo K-. B. Controllo K+. C. Follicolo primordiale negativo alla colorazione TUNEL appartenente ad un campione di corticale appena prelevata. D. 1 follicolo primordiale e un follicolo primario negativi alla colorazione TUNEL appartenente a un campione di corticale criopreservata.

### **4.3 Microscopia elettronica**

L'analisi ultrastrutturale effettuata, ha permesso di elaborare considerazioni sovrapponibili per tutte e tre le pazienti.

#### *Ultrastruttura dei follicoli*

L'osservazione ultrastrutturale ha evidenziato ovociti con nucleo regolare, membrana intatta e cromatina finemente dispersa. Il citoplasma appariva chiaro e ricco in mitocondri rotondeggianti disposti in zona perinucleare, con creste ben distribuite e visibili.

Le cellule della granulosa apparivano ben adese all'ovocita e ben preservate con citoplasma chiaro, privo di granulazioni e nucleo con cromatina finemente dispersa.

L'ultrastruttura dei follicoli dopo scongelamento ha mostrato una normale coesione tra le cellule della granulosa e l'ovocita, cromatina nucleare dispersa e microvacuolizzazione citoplasmatica. A livello ovocitario si evidenziava la presenza di lipofuscine e di mitocondri svuotati in cui non erano più riconoscibili le creste interne.

#### *Ultrastruttura dello stroma*

L'osservazione del tessuto fresco ha evidenziato cellule stromali fuse con cromatina moderatamente dispersa, citoplasma chiaro ben distribuito e organelli in zona perinucleare.

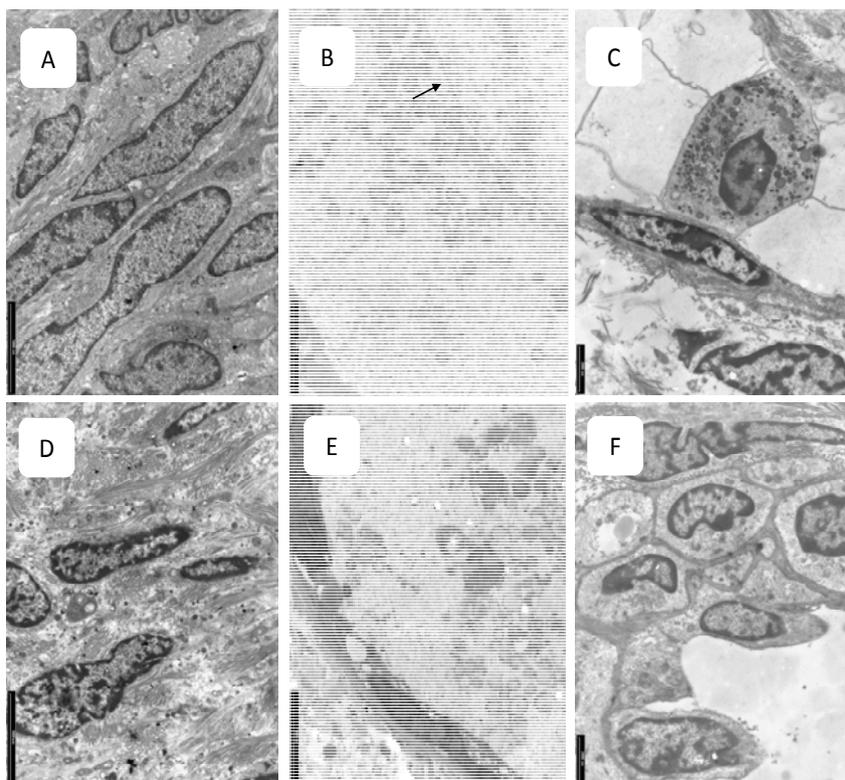
L'analisi del tessuto scongelato ha mostrato uno stroma con cromatina moderatamente addensata. Il citoplasma delle cellule stromali si presentava chiaro e frammentato, con edema

della componente mitocondriale; sono in evidenza anche fibre collagene.

Il lieve grado di danneggiamento osservato nel tessuto scongelato, sia al microscopio ottico che elettronico a trasmissione, non è risultato, tuttavia, significativo ( $P=0$ ).

#### *Ultrastruttura dei vasi*

I vasi capillari della corticale ovarica si sono dimostrati molto resistenti alla procedura di congelamento / scongelamento; infatti in tutte e tre le pazienti l'osservazione del tessuto scongelato ha dimostrato come le cellule endoteliali non avessero subito alterazioni submicroscopiche significative rispetto al tessuto fresco di controllo.



**Figura 9.** **A, B, C.** Corticale ovarica fresca. **A.** Si evidenziano cellule stromali con citoplasma integro ben distribuito, il nucleo con cromatina dispersa e alcune fibre collagene. **B.** Follicolo primordiale in cui si osserva il nucleo dell'ovocita ( $\uparrow$ ), mitocondri a cluster. Vaso in cui si osservano cellule endoteliali ben preservate e polimorfo nucleato all'interno del lume. **D, E, F.** Corticale ovarica criopreservata. **D.** Si evidenziano cellule stromali con citoplasma frammentato, il nucleo con cromatina addensata e alcune fibre collagene. **E.** Follicolo primordiale in cui si osserva cellule della granulosa con micro vacuolizzazione citoplasmatica, mitocondri svuotati e lipofuscine all'interno dell'ovocita. **F.** Vaso in cui si osservano cellule endoteliali e muscolari della parete del lume ben preservate.

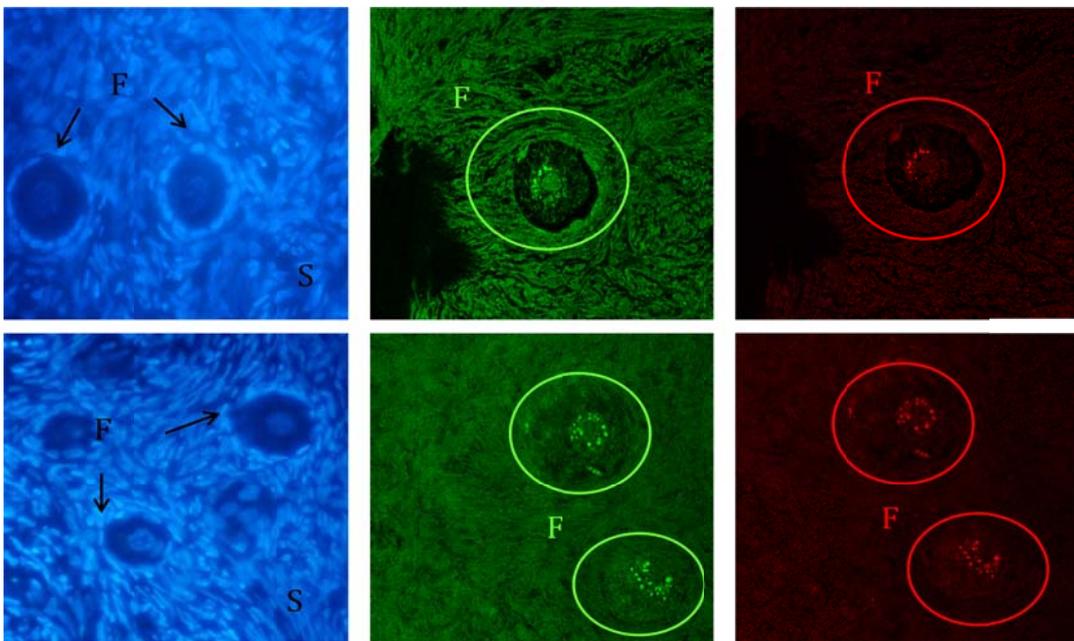
#### 4.4 Microscopia Laser Scanning Confocale

L'analisi al microscopio confocale effettuata, ha permesso di elaborare considerazioni sovrapponibili per tutte e tre le pazienti.

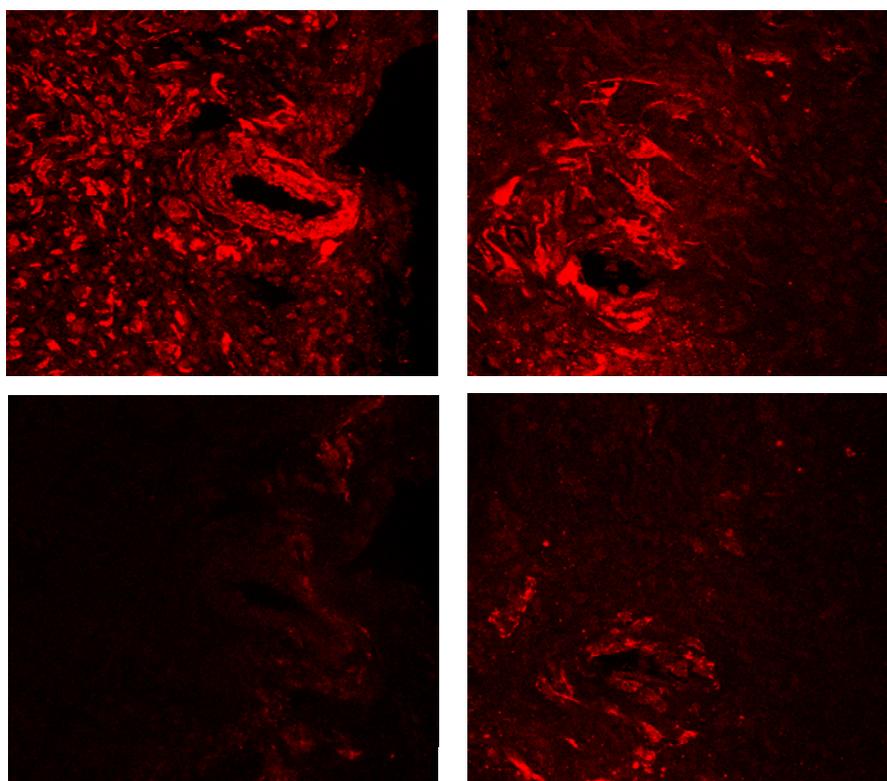
Morfologicamente sia il tessuto fresco sia il tessuto criopreservato hanno evidenziato stroma cellulato compatto con nuclei a regolare disegno cromatinico; follicoli, principalmente allo stadio primordiale (93%) e vasi ben preservati (**Figura 10**). Per

quel che riguarda la valutazione dell'indice apoptotico follicolare, stromale e vasale, nei campioni analizzati non sono state identificate caratteristiche apoptotiche.

L'analisi qualitativa dei follicoli ha evidenziato la presenza di entrambi i segnali di fluorescenza. Il segnale riguardante i mitocondri è risultato piuttosto basso rispetto al segnale osservabile nell'ooplasma di ovociti con completata fase di accrescimento somatico (**Figura 10**). Tale livello del segnale è stato considerato indicativo della presenza di un limitato numero di mitocondri in attiva respirazione. Il segnale relativo alla produzione di ROS ha indicato un livello contenuto di  $H_2O_2$ , in tutti i campioni analizzati (**Figura 11**). Complessivamente si è potuto osservare che i mitocondri non variano sia per distribuzione che per numero tra i campioni freschi e criopreservati. A livello stromale la colorazione MitoTracker Orange CMTM Ros ha consentito di osservare aggregazioni di mitocondri attivi a livello citoplasmatico. Anche in questo caso il segnale riguardante i mitocondri è risultato piuttosto basso rispetto al segnale osservabile nell'ooplasma di ovociti con completata fase di accrescimento somatico. Il livello del segnale è stato considerato indicativo della presenza di un limitato numero di mitocondri in attiva respirazione. La colorazione con DCF omogeneamente diffusa ha consentito di osservare una definizione netta dei contorni cellulari, sia per lo stroma ovarico, sia per le cellule della granulosa.



**Figura 10.** Colorazione blu-frammentazione DNA. Colorazione verde-stress ossidativo. Colorazione rossa-mitocondri in attività. (prima linea:corticale fresca, seconda linea: corticale criopreservata).



**Figura 11.** Colorazione rossa-mitocondri in attività, si riconoscono 4 vasi di diverso calibro.

#### **4.5 Follow-up: profili ormonali, indagini ecografiche e dopplerflussimetria**

Dopo il reimpianto la funzionalità ovarica di ciascuna paziente è stata monitorata valutando l'indagine ecografica, dopplerflussimetria e i dosaggi ormonali di FSH, LH ed Estradiolo.

##### *Paziente 1*

Dopo il reimpianto la funzionalità ovarica è stata monitorata con esami ecografici ed ormonali ad intervalli di circa 3 settimane.

I primi segni di ripresa della funzionalità ovarica sono stati osservati 2 mesi e mezzo dopo il reimpianto, con diminuzione dei livelli di FSH (da 159,7 a 90,4 mIU/mL) e LH (da 81,1 a 34,5 mIU/mL) e un aumento dei livelli di Estradiolo (da <12 a 78 pg/mL); l'indagine ecografica ha rivelato lo sviluppo di un follicolo del diametro di 6 mm nell'ovaio sinistro, il color doppler ha rilevato un' iniziale vascolarizzazione che

è andata progressivamente aumentando nei successivi controlli (AUPI=2.04, ov dx AOPI=2.10, ASPI=nv; ov sx AOPI=2.08, ASPI=nv) (**Figura 12**).

Parallelamente gli esami ecografici hanno rivelato sviluppo follicolare in entrambe le ovaie: 1 follicolo (5 mm) nell'ovaio destro e 2 (6 e 12 mm) nell'ovaio sinistro.

Gli esami ecografici sono stati supportati anche dai livelli ormonali di FSH e LH che hanno mostrato una ulteriore diminuzione (55.1 mIU/mL, 33.3 mIU/mL) e da quelli di Estradiolo che sono aumentati (159 pg/mL).

Circa quattro mesi dopo il reimpianto la paziente ha spontaneamente avuto il primo ciclo mestruale; è stata quindi monitorata con dosaggi ormonali ad intervalli di 7 giorni.

Sebbene i livelli di FSH continuavano a diminuire, nei 2 mesi successivi la paziente non ha mestruato.

Per questo motivo si è deciso di somministrarle il Dufaston per una settimana (progestinico di sintesi con attività simile a quella del progesterone), al termine della quale la paziente ha avuto il suo secondo ciclo mestruale.

Undici giorni dopo, i livelli di FSH e LH sono diminuiti ulteriormente (rispettivamente fino a 19.4 mIU/ mL e 10.7 mIU/ mL) e l'ecografia ha mostrato un follicolo di 17 mm nell'ovaio sinistro. La paziente ha avuto la terza mestruazione spontanea 26 giorni dopo la precedente.

A più di un anno dal reimpianto l'andamento del profilo ormonale è rimasto pressoché invariato rispetto a quello dei cicli precedenti, lo sviluppo follicolare è ancora presente nei siti di reimpianto e ad intervalli di 40-45 giorni la paziente continua ad avere cicli mestruali spontanei.

L'andamento dei livelli di FSH, LH ed Estradiolo è mostrato nel **Grafico 1**.

#### *Paziente 2*

Dopo il reimpianto la funzionalità ovarica è stata monitorata con esami ecografici ed ormonali ad intervalli di circa 3 settimane.

I livelli sierici di FSH ed LH (rispettivamente 110.92 mIU/mL e 48.3 mIU/mL) sono rimasti elevati nei due mesi successivi al reimpianto.

Un mese dopo il reimpianto iniziava ad apprezzarsi un aumento della vascolarizzazione degli innesti (PI dx=1.96, PIsx=1.02). Le ovaie risultavano omogenee senza segni funzionali e vascolari (**Figura 13**).

I primi segni di ripresa della funzionalità ovarica sono stati osservati circa 4 mesi dopo il reimpianto, confermati dalla diminuzione dei livelli di FSH (fino a 53.9 mIU/mL) e LH (fino a 41,3 mIU/mL) e dall'aumento dei livelli di Estradiolo (fino a 112,8 pg/ml).

Gli esami ormonali sono stati supportati dall'esame ecografico che ha mostrato la presenza di 5 follicoli nell'area sinistra di reimpianto (delle dimensioni di 2,3,4,4,4 mm) e 4 nell'area destra di reimpianto (rispettivamente 4,6,6,8 mm) apprezzabili anche al tatto; il color doppler ha rilevato inoltre un aumento della vascolarizzazione (AUPI=1.72, PIdx=1.42, PIsx=0.94).

Parallelamente la paziente ha riferito la scomparsa dei sintomi menopausali. Successivamente i livelli ormonali di FSH, LH ed Estradiolo hanno raggiunto valori rispettivamente di 9.35 mIU/mL, 11.11 mIU/mL, 526.9 pg/ml.

Otto mesi dopo il reimpianto la paziente ha avuto il suo primo ciclo mestruale. L'indagine ecografica ha mostrato sviluppo follicolare oltre che nei siti di reimpianto anche a livello dell'ovaio sinistro atrofico con 2 follicoli (14 e 3 mm). Il color doppler ha rilevato a livello ovarico i seguenti valori AUPI=2.04, ov dx AOPI=2.04, ASPI=nv; ov sx AOPI=2.06, ASPI=nv).

Ad intervalli di 24-26 giorni la paziente continua ad avere cicli mestruali spontanei. L'andamento dei livelli di FSH, LH ed Estradiolo è mostrato nel **Grafico 2**.

### *Paziente 3*

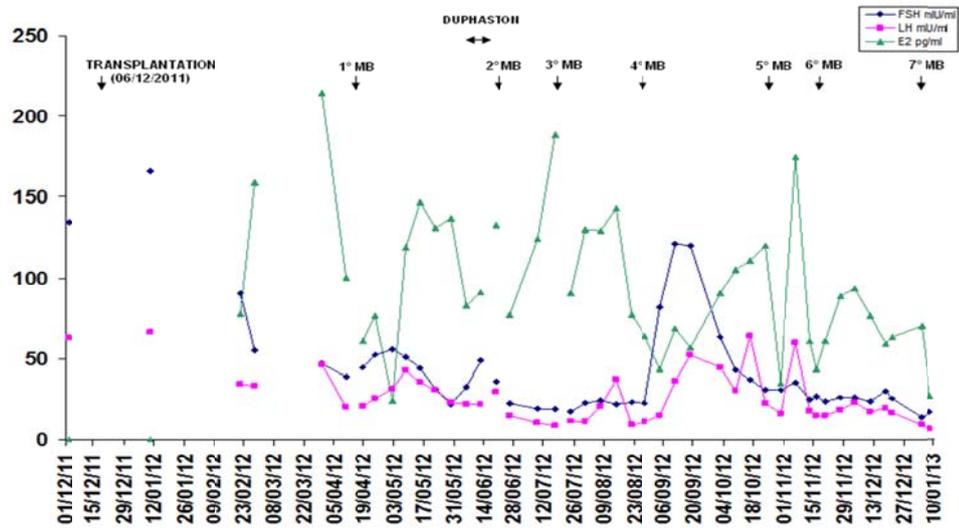
Dopo il reimpianto la funzionalità ovarica è stata monitorata con esami ecografici ed ormonali ad intervalli di circa 3 settimane.

Due mesi dopo il trapianto i livelli di FSH e LH hanno raggiunto valori di 37,8 mIU/ml e 30,0 mIU/mL, e l'Estradiolo è rimasto ancora basso (<12 pg/ml). L'ecografia transvaginale ha mostrato la presenza di due follicoli (6 e 7 mm) sul ovaio destro, due follicoli (6 e 15 mm) sull'ovaio sinistro e un follicolo di 15 mm nella tasca peritoneale destra. Il color doppler ha rilevato a livello ovarico i seguenti valori AUPI=2.04, ov dx AOPI=1.97, ASPI=nv; ov sx AOPI=2.03, ASPI=nv).

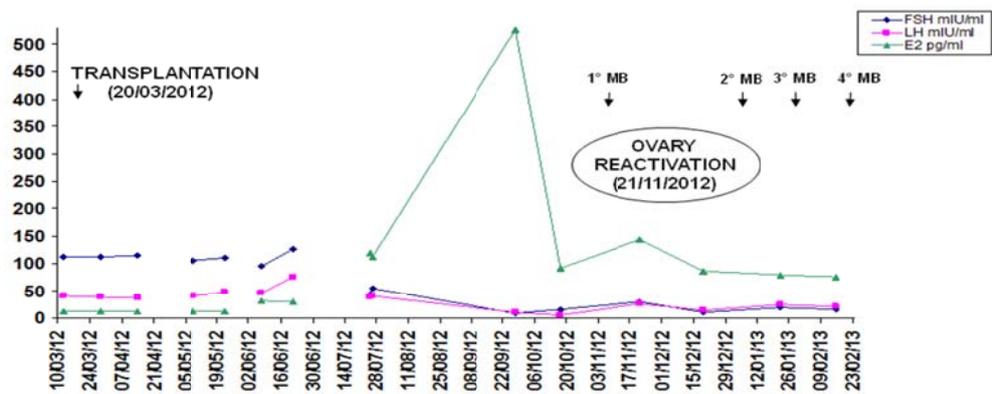
I seguenti esami hanno mostrato valori ormonali quasi inalterati e sviluppo follicolare in entrambi i siti ortotopici.

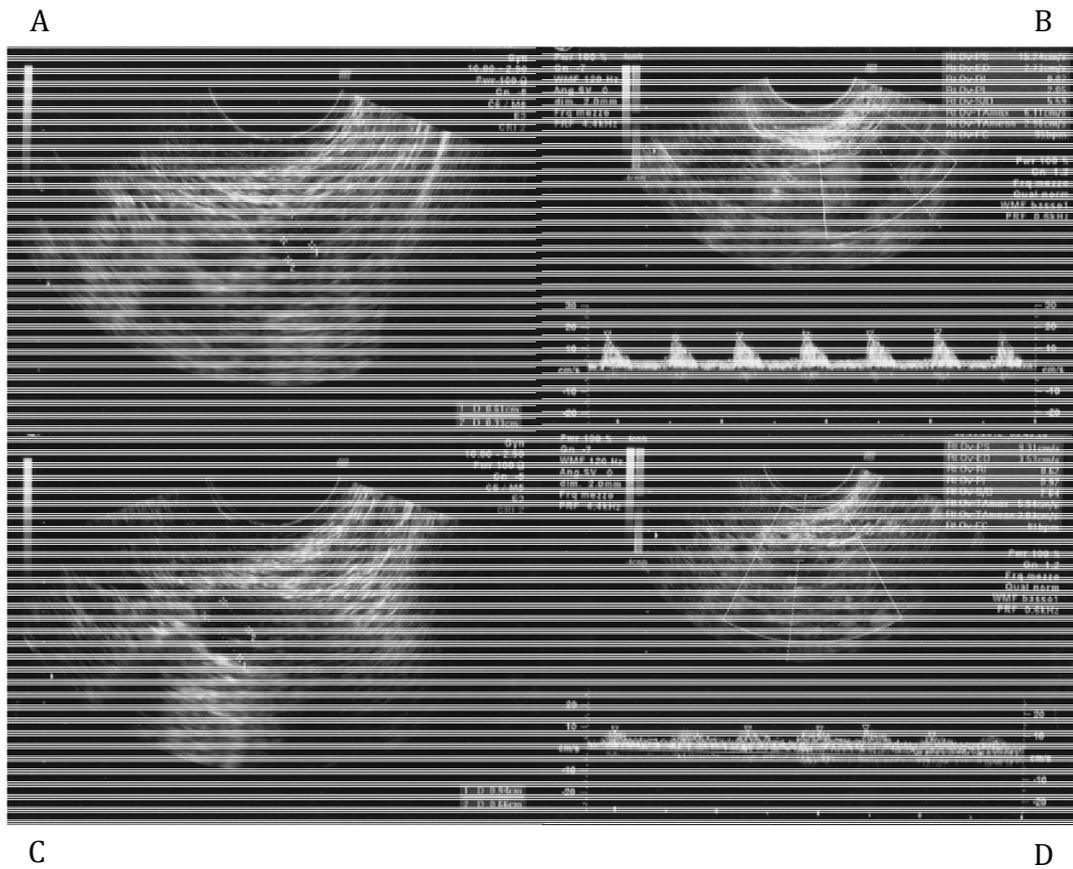
Tuttavia, fino ad ora, la paziente non ha avuto mestruazioni.

**Grafico 1.** Immagine A: Paziente 1.

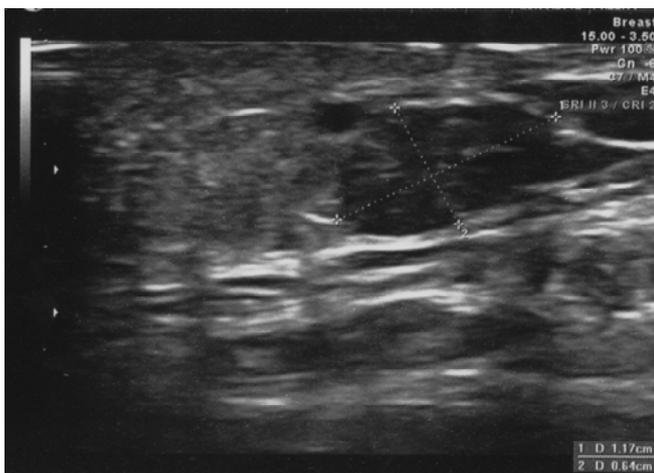


**Grafico 2.** Immagine B: Paziente 2.





**Figura 12.** A. Ecografia ovaio destro dopo il reimpianto orto topico (Paziente 1), in cui si evidenziano due follicoli. B. Color doppler dell’ovaio destro dopo il reimpianto ortotopico, in cui si evidenzia vascolarizzazione (Paziente 1). C. Ecografia ovaio sinistro dopo il reimpianto ortotopico (Paziente 1), in cui si evidenziano due follicoli. D. Color doppler dell’ovaio sinistro dopo il reimpianto ortotopico, in cui si evidenzia vascolarizzazione (Paziente 1).



**Figura 13.** Ecografia del sito di reimpianto etero topico (Paziente 2) nel sottocute sovrapelvico.

## 5. CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI PROSPETTICHE

Lo sviluppo di nuovi trattamenti chemio e radioterapici per la cura di patologie tumorali ha notevolmente aumentato l'aspettativa di vita di pazienti affette da neoplasie.

Tali trattamenti, tuttavia, sono gonadotossici e rischiano di compromettere la funzionalità del tessuto gonadico.

La crioconservazione di tessuto ovarico rappresenta una strategia innovativa e molto promettente per preservare la fertilità.

In particolare, essa consente di preservare un elevato numero di follicoli primordiali contenenti ovociti immaturi, che risultano essere molto resistenti ai processi di congelamento e scongelamento (Donnez 2008); non richiede stimolazione ormonale; può essere effettuata in qualsiasi momento del ciclo mestruale, evitando così ritardi nell'inizio dei trattamenti; ed è la sola metodica applicabile nel caso di pazienti pre-puberi e nelle pazienti affette da tumori ormono-sensibili che non possono sottoporsi a stimolazione ormonale.

La crioconservazione con il successivo reimpianto di tessuto ovarico, inoltre, permette di ripristinare sia la funzione riproduttiva sia la funzionalità endocrina; garantendo un miglioramento della qualità della vita, nelle pazienti adulte, evitando la menopausa precoce e nelle pazienti pre-puberi consentendo un normale sviluppo fisiologico.

La ripresa della funzionalità ovarica è stata documentata sia in seguito a reimpianto ortotopico che eterotopico e ad oggi, nel mondo, sono nati 22 bambini in seguito a reimpianto ortotopico.

Al contrario non è stata ottenuta nessuna nascita dopo reimpianto eterotopico poiché gli ovociti maturi recuperati da siti eterotopici non hanno portato allo sviluppo di embrioni di buona qualità da utilizzare in un programma di fecondazione in vitro.

Probabilmente il sito eterotopico non costituisce un ambiente ottimale per lo sviluppo follicolare a causa di differenze in temperatura, pressione, fattori endocrini e vascolarizzazione rispetto all'ovaio.

Il sito eterotopico risulta però particolarmente vantaggioso quando, a causa di trattamenti radioterapici o di severe adesioni pelviche non è possibile entrare nella pelvi, oppure quando si desidera mantenere la funzionalità endocrina a lungo termine, situazione che prevede l'effettuazione di più reimpianti.

In questo lavoro sono stati riportati i casi clinici, le metodologie e i risultati ottenuti da tre pazienti che hanno effettuato reimpianto ortotopico (due pazienti) e eterotopico (una paziente).

Le Pazienti 1-3 sono state sottoposte a reimpianto ortotopico essendo interessate a ripristinare non solo la funzionalità steroidogenica ma anche quella gametogenica, nella speranza di poter realizzare il desiderio di maternità.

La Paziente 2 invece è stata sottoposta a reimpianto eterotopico in quanto interessata solo al ripristino della funzionalità steroidogenica per contrastare i sintomi menopausali, in particolare una severa osteopenia.

Il tessuto ovarico è stato accuratamente analizzato, prima e dopo la procedura di congelamento/ scongelamento per evitare di reimpiantare cellule maligne nella paziente e per valutare la preservazione del tessuto. La presenza di metastasi è stata valutata mediante analisi istologica e immunoistochimica. Un recente studio ha valutato l'incidenza di metastasi ovariche in varie patologie, stimando ad alto rischio le leucemia, moderato i tumori gastro-intestinali, e basso il cancro della mammella, sarcomi dell'osso, del tessuto connettivo e linfomi (Rosendhal et al., 2013). Tuttavia, anche per le malattie in cui il rischio è basso, la presenza di metastasi nell'ovaio non può essere esclusa e un'attenta analisi deve essere sempre eseguita per valutare la sicurezza della procedura di trapianto.

Inoltre nelle tre pazienti sono stati valutati: il grado di preservazione e numero dei follicoli ovarici, e il grado di preservazione delle cellule stromali e dei vasi sanguigni mettendo a confronto i campioni scongelati con i campioni freschi. Numerosi studi (Fabbri et al., 2010) hanno riportato la perdita di follicoli a causa di un' aumentata apoptosi e necrosi nel tessuto ovarico dopo il congelamento, influenzando così l'esito del reimpianto. Le analisi al microscopio ottico, elettronico a trasmissione e confocale sui campioni di corticale scongelata hanno mostrato una buona preservazione della maggior parte dei follicoli, delle cellule stromali e dei vasi sanguigni. Nessun segno di induzione dell'apoptosi è stato osservato (TUNEL assay)

confermando così la validità della procedura di crioconservazione. Sulla base della densità follicolo e il numero di pezzi disponibili, abbiamo stabilito per ogni paziente il numero di fettine ovariche da reimpiantare.

In tutti i tre casi lo sviluppo follicolare e la ripresa della funzione steroidogenica sono stati osservati in accordo con i tempi attesi (Gougeon, 1996) e con i risultati dei precedenti studi.

Il processo di follicologenesi, infatti, richiede parecchi mesi (dai 2 agli 8 mesi) durante i quali l'ovocita e le cellule della granulosa subiscono dei cambiamenti che risulteranno nello sviluppo di un follicolo antrale in grado di produrre un ovocita maturo (Gougeon, 1996).

Il tempo per la ripresa della funzionalità del tessuto dipende inoltre da vari fattori fra cui la riserva follicolare della paziente al momento della crioconservazione, relazionabile sia con l'età che con eventuali trattamenti chemioterapici effettuati prima della crioconservazione, ma anche dalle tempistiche della neoangiogenesi ovarica e il tempo di ischemia che i follicoli devono subire.

Per le pazienti oggetto dello studio, in accordo con i dati pubblicati in letteratura, sono stati necessari, dopo il reimpianto, rispettivamente 2 mesi e mezzo per la *Paziente 1* (reimpianto ortotopico) e 4 mesi per la *Paziente 2* (reimpianto eterotopico) per la ripresa della funzionalità del tessuto evidenziata da un aumento dei livelli di estradiolo, da una relativa diminuzione dei livelli di FSH e LH e dallo sviluppo di follicoli nei siti di reimpianto.

Per quanto riguarda la *Paziente 1*, inoltre, è importante sottolineare che, sebbene abbia avuto cicli mestruali, i livelli di FSH rimanevano elevati durante la fase follicolare fino all'ovulazione, mentre i livelli di Progesterone rimanevano piuttosto bassi.

Questo dato concorda con quanto riportato in letteratura (Donnez et al., 2008); infatti questi livelli ormonali potrebbero indicare che la paziente presentava un ridotto numero di follicoli primordiali nel tessuto reimpiantato ed è da considerarsi una paziente *poor responder*.

Per quanto riguarda la *Paziente 2*, così come riportato anche da Oktay nel 2004, lo sviluppo di follicoli nel sottocute dell'addome sembra supportare precedenti

osservazioni secondo cui il sottocute dell'addome sembra essere un sito di reimpianto idoneo per la ripresa della funzionalità del tessuto ovarico (Oktay et al., 2004).

Dato molto interessante, è che pochi mesi dopo il reimpianto si ottiene anche il recupero dell'attività ovarica. Questo risultato è stato precedentemente riportato solo in un altro caso ipotizzando diverse spiegazioni (Oktay, 2011). Il tessuto ovarico reimpiantato eterotopicamente avrebbe stimolato la rigenerazione dei follicoli dalle cellule germinali residue, o in alternativa le cellule staminali nel tessuto ovarico crioconservato sarebbero migrate dal sito eterotopico alle ovaie riattivandole. Un'altra ipotesi potrebbe essere che le cellule germinali del midollo osseo, stimolate dal tessuto ovarico reimpiantato, migrino verso l'ovaio atrofico attraverso il flusso sanguigno, dando origine a nuovi follicoli.

Per la *Paziente* considerando l'età al momento della crioconservazione e la bassa densità follicolare dei campioni stoccati è stato deciso di reimpiantare tutto il tessuto crioconservato, al fine di aumentare le possibilità di recupero funzione ovarica, che si è verificato 2 mesi dopo il trapianto con diminuzione dei livelli di LH e FSH e sviluppo di follicoli ovarici. Tuttavia, la paziente non ha avuto ancora le mestruazioni.

I risultati ottenuti suggeriscono, che il tessuto ovarico mantenuto a  $-196^{\circ}\text{C}$ , mantiene la vitalità per molti anni: nei nostri casi il tessuto è rimasto crioconservato rispettivamente per 7, 12 e 7 anni.

Il risultato è confermato anche dai dati presenti in letteratura, in cui il tessuto ovarico reimpiantato dopo oltre 6 anni dalla crioconservazione ha ripristinato sia la funzione steroidogenica che gametogenica (Grynberg et al., 2012).

Ulteriore dato molto interessante per il reimpianto ortotopico emerso da questo studio, in contraddizione con gli studi effettuati in precedenza è l'avvenuta neovascolarizzazione dell'ovaio effettuando un solo *step* di laparoscopia. In questo modo inoltre la paziente subisce minore stress provocato invece dai due *step* laparoscopici utilizzati in tutti gli altri casi di reimpianto. Si può affermare nuovamente, che il protocollo di crioconservazione impiegato non apporta sostanziali modifiche alla preservazione vascolare.

Lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni nella ovaio dopo reimpianto è essenziale per garantire il necessario approvvigionamento di sostanze nutritive e gli ormoni per favorire la crescita del follicolo e la formazione del corpo luteo.

Uno dei problemi principali della sopravvivenza follicolare è l'ischemia e ipossia durante i primi giorni dopo il reimpianto, inoltre come testimoniato da Gosden (Gosden, 2000) il 50% dei follicoli primordiali vengono persi a causa di ischemia e ipossia durante tutte le procedure di crioconservazione. Il limitato apporto di ossigeno durante queste fasi potrebbe essere il fattore cruciale per l'induzione del'up-regulation angiogenetico del fattore di crescita vascolare endoteliale. Fattore forse tra i più importanti per l'attivazione della neoangiogenesi nel reimpianto (Rahimi et al., 2010).

Anche se i risultati conseguiti sono incoraggianti, sono necessari ulteriori studi finalizzati a promuovere e migliorare la vascolarizzazione nella sede dell'impianto. La neoangiogenesi potrebbero essere stimolata: 1. chirurgicamente mediante la manipolazione della zona dell'impianto, 2. applicando un derivato biologico autologo come il gel piastrinico ottenuto dalla paziente prima dell'impianto, strategia che già viene utilizzata clinicamente nella guarigione delle ferite difficili, 3. infondendo localmente, previa opportuna autorizzazione, cellule staminali mesenchimali autologhe che modulando positivamente la risposta infiammatoria locale possono promuovere l'angiogenesi e i processi dell'immunità innata.

Il lavoro presentato ha dimostrato che il tessuto ovarico può sopravvivere alle procedure di congelamento- scongelamento e al reimpianto, sia esso ortotopico che eterotopico, e che la funzionalità del tessuto si è ripristinata in tutte e due le metodologie di reimpianto di fettine di corticale ovarica crioconservata.

## 6. FONTI E RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

**Abir R, Orvieto R, Raanani H, Feldberg D, Nitke S, Fisch B.** Parameters affecting successful transplantation of frozen-thawed human fetal ovaries into immunodeficient mice. *Fertil Steril.* 2003;80(2):421-8.

**Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG, Loft A, Ottosen C, Dueholm M, Schmidt KL, Andersen AN, Ernst E.** Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod.* 2008;23(10):2266-72.

**Bakhach J.** The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis.* 2009;5(3):119-26.

**Bath LE, Anderson RA, Critchley HOD, Kelnar CJ, Wallace WH.** Hypothalamic- pituitary-ovarian dysfunction after prepubertal chemotherapy and cranial irradiation for acute leukaemia. *Hum Reprod* 2001;16(9):1838-1844.

**Bedaiwy MA, El-Nashar SA, El Saman AM, Evers JL, Sandadi S, Desai N, Falcone T.** Reproductive outcome after transplantation of ovarian tissue: a systematic review. *Hum Reprod.* 2008;23(12):2709-17. Review

**Blumenfeld Z.** Chemotherapy and fertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2012;26(3):379-90.

**Burmeister L, Kovacs GT, Osianlis T.** First Australian pregnancy after ovarian tissue cryopreservation and subsequent autotransplantation. *Med J Aust.* 2013;198(3):158-9.

**Chiarelli AM, Marrett LD, Darlington GA.** Pregnancy outcomes in females after treatment for childhood cancer. *Epidemiology.* 2000;11(2):161-6.

**Coticchio G, Garetti S, Bonu MA, Borini A.** Cryopreservation of human oocytes. *Hum Fertil (Camb).* 2001;4(3):152-7.

**de Waal YR, Thomas CM, Oei AL, Sweep FC, Massuger LF.** Secondary ovarian malignancies: frequency, origin, and characteristics. *Int J Gynecol Cancer.* 2009;19(7):1160-5. Review.

**Demeestere I, Simon P, Moffa F, Delbaere A, Englert Y.** Birth of a second healthy girl more than 3 years after cryopreserved ovarian graft. *Hum Reprod.* 2010; 25(6):1590-1.

**Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y.** Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update.* 2009;15(6):649-65.

**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;12(12):1437-1442.

**Diller KR.** Intracellular freezing: effect of extracellular supercooling. *Cryobiology.* 1975;12(5):480-5.

**Donnez J, Jadoul P, Pirard C, Hutchings G, Demylle D, Squifflet J, Smitz J, Dolmans MM.** Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease. *Fertil Steril.* 2012;98(3):720-5.

**Donnez J, Squifflet J, Jadoul P, Demylle D, Cheron AC, Van Langendonckt A, Dolmans MM.** Pregnancy and live birth after autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a patient with metastatic disease undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Fertil Steril.* 2011; 95(5):1787.e1-4.

**Donnez J, Squifflet J, Van Eyck AS, Demylle D, Jadoul P, Van Langendonckt A, Dolmans MM.** Restoration of ovarian function in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(5): 694-704.

**Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonckt A, Demylle D, Dolmans MM.** Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Hum Reprod Update.* 2006;12(5):519-35.

**Donnez J, Squifflet J, Dolmans MM, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonckt A.** Orthotopic transplantation of fresh ovarian cortex: a report of two cases. *Fertil Steril.* 2005;84(4):1018.

**Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, Van Langendonck A.** Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*. 2004;364(9443):1405-1410.

**Ernst E, Bergholdt S, Jørgensen JS, Andersen CY.** The first woman to give birth to two children following transplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*. 2010;25(5):1280-1.

**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;49(4):911-4.

**Fabbri R, Marsella T, Diano C, et al.** Human ovarian tissue banking using DMSO as cryoprotectant. "Mammalian Follicle and Oocyte Culture", 19-22 June ESHRE Campus 99, Kilpisjärvi Biological Station, Finland. 1999;28-30 A.

**Fabbri R, Marsella T, Diano C, et al.** Human ovarian tissue banking using DMSO as cryoprotectant. Abstract of the Meeting Mammalian Follicle and Oocyte Culture; ABSTRACT.1999 B.

**Fabbri R, Pasquinelli G, Keane D, Magnani V, Paradisi R, Venturoli S.** Optimization of protocols for human ovarian tissue cryopreservation with sucrose, 1,2-propanediol and human serum. *Reprod Biomed Online*. 2010; 21(6):819-28 A.

**Fabbri R, Pasquinelli G, Magnani V, Tamburini F, Battaglia C, Paradisi R, Keane D, Venturoli S.** Preservation of ovarian function. *Minerva Ginecol*. 2010; 62(3):237-52 B.

**Fabbri R, Pasquinelli G, Bracone G, et al.** Fetal calf serum versus human serum: ultrastructural evaluation of protein support influence on human ovarian tissue cryopreservation. *Ultrastruct Pathol*. 2006A; 30: 1-8.

**Fabbri R, Pasquinelli G, Bracone G, Orrico C, Di Tommaso B, Venturoli S.** Cryopreservation of human ovarian tissue. *Cell Tissue Bank* 2006B;7(2):123-33.

**Fabbri R, Venturoli S, D'Errico A, et al.** Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation. *Gynecol Oncol* 2003;89:259-266.

- Familiari G, Caggiati A, Nottola SA, Ermini M, Di Benedetto MR, Motta PM.** Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. *Hum Reprod.* 1993;8:2080-2087.
- Fleischer RT, Vollenhoven BJ, Weston GC.** The effects of chemotherapy and radiotherapy on fertility in premenopausal women. *Obstet Gynecol Surv.* 2011;66(4):248-54. Review.
- Gook DA, Edgar DH, Stern C.** Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1, 2-propanediol. *Hum Reprod.* 1999;14(8):2061-8.
- Gook DA, Edgar DH, Stern C.** The effects of cryopreservation regimens on the morphology of human ovarian tissue. *Molec and Cell Endocrinology* 2000;169:99-103.
- Gougeon A.** Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996;17(2):121-55.
- Gosden RG.** Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;163(1-2):125-9. Review.
- Grynberg M, Poulain M, Sebag-Peyrelevade S, le Parco S, Fanchin R, Frydman N.** Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. *Fertil Steril.* 2012;97(6):1260-8. Review.
- Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, Lass A, Winston RM.** Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod.* 1996;11(6):1268-72.
- Hreinsson J, Zhang P, Swahn ML, et al.** Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions. *Human Reprod.* 2003;18(11):2420-2428.
- Israely T, Nevo N, Harmelin A, Neeman M, Tsafiriri A.** Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissue. *Hum Reprod.* 2006;21(6):1368-79.
- Jeong K, Aslan E, Ozkaya E, Sonmezer M, Oktay K.** Ovarian cryopreservation. *Minerva Med.* 2012;103(1):37-46. Review.

**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;91(6):2349-54.

**Kim SS, Hwang IT, Lee HC.** Heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue as a strategy to restore ovarian function. *Fertil Steril.* 2004;82(4):930-2.

**Kim SS, Radford J, Harris M, Varley J, Rutherford AJ, Lieberman B, Shalet S, Gosden R.** Ovarian tissue harvested from lymphoma patients to preserve fertility may be safe for autotransplantation. *Hum Reprod.* 2001;16(10):2056-60.

**Kyono K, Doshida M, Toya M, Sato Y, Akahira J, Sasano H.** Potential indications for ovarian autotransplantation based on the analysis of 5,571 autopsy findings of females under the age of 40 in Japan. *Fertil Steril.* 2010;93(7):2429-30.

**Lee SJ, Bae JH, Lee AW, Tong SY, Park YG, Park JS.** Clinical characteristics of metastatic tumors to the ovaries. *J Korean Med Sci.* 2009;24(1):114-9.

**Lunardi FO, Araújo VR, Bernuci MP, Lunardi LO, Gonçalves RF, Carvalho AD, de Figueiredo JR, Rodrigues AP.** Restoring fertility after ovarian tissue cryopreservation: a half century of research. *Zygote.* 2012;31:1-12.

**Meirow D, Nugent D.** The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update.* 2001;7:535-543.

**Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, et al.** Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med.* 2005; 353(3):318-321.

**Meirow D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E, Raanani H, Levron J, Fridman E.** Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod.* 2007;22(6):1626-33.

**Michaeli J, Weintraub M, Gross E, Ginosar Y, Ravitsky V, Eizenman E, Mitrani E, Lebovich M, Laufer N, Kennedy S, Revel A.** Fertility preservation in girls. *Obstet Gynecol Int.* 2012;2012:139193.

**McGee EA, Hsueh AJ.** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000;21(2):200-14. Review.

**Müller A, Keller K, Wacker J, Dittrich R, Keck G, Montag M, Van der Ven H, Wachter D, Beckmann MW, Distler W.** Retransplantation of cryopreserved ovarian tissue: the first live birth in Germany. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(1-2):8-13.

**Netter H. Frank.** APPARATO RIPRODUTTIVO VOL. 3- Atlante di Anatomia Fisiopatologia e Clinica. Casa Editrice: Masson. Anno Edizione: 2002.

**Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R.** Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod.* 1996;11(7):1487-91.

**Nisolle M, Casanas-Roux F, Qu J, Motta P, Donnez J.** Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. *Fertil Steril.* 2000;74(1):122-9.

**Oktay K, Nugent D, Newton H, Salha O, Chatterjee P, Gosden RG.** Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril.* 1997;67(3):481-6.

**Oktay K, Buyuk E, Veeck L, Zaninovic N, Xu K, Takeuchi T, Opsahl M, Rosenwaks Z.** Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet.* 2004;363(9412):837-40.

**Oktay K, Türkçüoğlu I, Rodriguez-Wallberg KA.** Four spontaneous pregnancies and three live births following subcutaneous transplantation of frozen banked ovarian tissue: what is the explanation? *Fertil Steril.* 2011;95(2):804.e7-10.

**Paradisi R, Fabbri R, Magnani V, Battaglia C, Venturoli S.** A new simple technique of laparoscopic temporary ovarian suspension in addition to ovarian cryopreservation for women prior to posterior pelvic radiation. *Gynecol Oncol.* 2010;117(2):385-6.

**Piver P, Amiot C, Agnani G et al.** Two pregnancies obtained after a new technique of autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. 25<sup>th</sup> Annual Meeting of ESHRE, Amsterdam, 2009. *Hum Reprod.* 2009: il5.

**Poirot C, Vacher-Lavenu M, Helardot P. et al.** Human ovarian tissue cryopreservation: indications and feasibility. *Hum Reprod.* 2002;17:1447-52.

**Poirot C, Abirached F, Prades M, Coussieu C, Bernaudin F, Piver P.** Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet.* 2012;379(9815):588.

**Rahimi G, Isachenko V, Kreienberg R, Sauer H, Todorov P, Tawadros S, Mallmann P, Nawroth F, Isachenko E.** Re-vascularisation in human ovarian tissue

after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;149(1):63-7.

**Revel A, Laufer N, Ben Meir A, Lebovich M, Mitrani E.** Micro-organ ovarian transplantation enables pregnancy: a case report. *Hum Reprod.* 2011;26(5):1097-103.

**Revelli A, Marchino G, Dolfin E, Molinari E, Delle Piane L, Salvagno F, Benedetto C.** Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy. *Fertil Steril.* 2013;99(1):227-30.

**Rosendahl M, Greve T, Andersen CY.** The safety of transplanting cryopreserved ovarian tissue in cancer patients: a review of the literature. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(1):11-24.

**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;93(7):2413.e15-9.

**Sánchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escribá MJ, Simón C, Pellicer A.** Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril.* 2010; 93(1):268.e11- 3.

**Shaw JM, Jones GM.** Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update.* 2003;9(6):583-605. Review.

**Silber SJ et al.** Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril,* 2010;94(6):2191-96.

**Silber SJ, DeRosa M, Pineda J, Lenahan K, Grenia D, Gorman K, Gosden RG.** A series of monozygotic twins discordant for ovarian failure: ovary transplantation (cortical versus microvascular) and cryopreservation. *Hum Reprod,* 2008;23(7): 1531-37.

**Schmidt KL, Ernst E, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Yding Andersen C.** Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Hum Reprod.* 2003;18(12):2654-9.

**Stern CJ, Toledo MG, Hale LG, Gook DA, Edgar DH.** The first Australian experience of heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue: evidence of establishment of normal ovarian function. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2011;51(3): 268-75.

**Stern CJ, Toledo MG, Gook DA.** Fertility preservation in female oncology patients. Aust NZJ Obstet Gynaecol. 2006;46:15-23.

**Telfer EE *et al.*** A two- step serum- free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. Hum Reprod, 2008; 23(5):1151-8.

**Thibaud E, Rodriguez-Macias K, Trivin C, Espérou H *et al.*** Ovarian function after bone marrow transplantation during childhood. Bone Marrow Transplant. 1998; 21(3):287-90.

**Tilly JL.** Apoptosis and ovarian function. Rev Reprod. 1996;1(3):162-72. Review.

**Turan T, Aykan B, Koc S, Boran N, Tulunay G, Karacay O, Erdogan Z, Kose F.** Analysis of metastatic ovarian tumors from extragenital primary sites. Tumori. 2006;92(6):491-5.

**Wallace WH, Shalet SM, Hendry JH, Morris-Jones PH, Gattamaneni HR.** Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: the radiosensitivity of the human oocyte. Br J Radiol. 1989;62(743):995-8.

**Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW.** The radiosensitivity of the human oocyte. Hum Reprod. 2003;18(1):117-21.

**Wølner-Hanssen P, Hägglund L, Ploman F, Ramirez A, Manthorpe R, Thuring A.** Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue to the right forearm 4(1/2) years after autologous stem cell transplantation. Acta Obstet Gynecol Scand. 2005; 84(7):695-8.

**<http://www.registri-tumori.it/cms/>**