

CRIOCONSERVAZIONE DI TESSUTO OVARICO

Aspetti di Laboratorio

Dott. Nunzio Minniti

Gruppo Genesi - Palermo
ARCA Service - Livorno
Centro ASTER - Ragusa

Introduzione

La capacità di conservare cellule in uno stato di "animazione sospesa" al di fuori del corpo è diventata un aspetto importantissimo nell'elaborazione di molte moderne terapie cliniche.

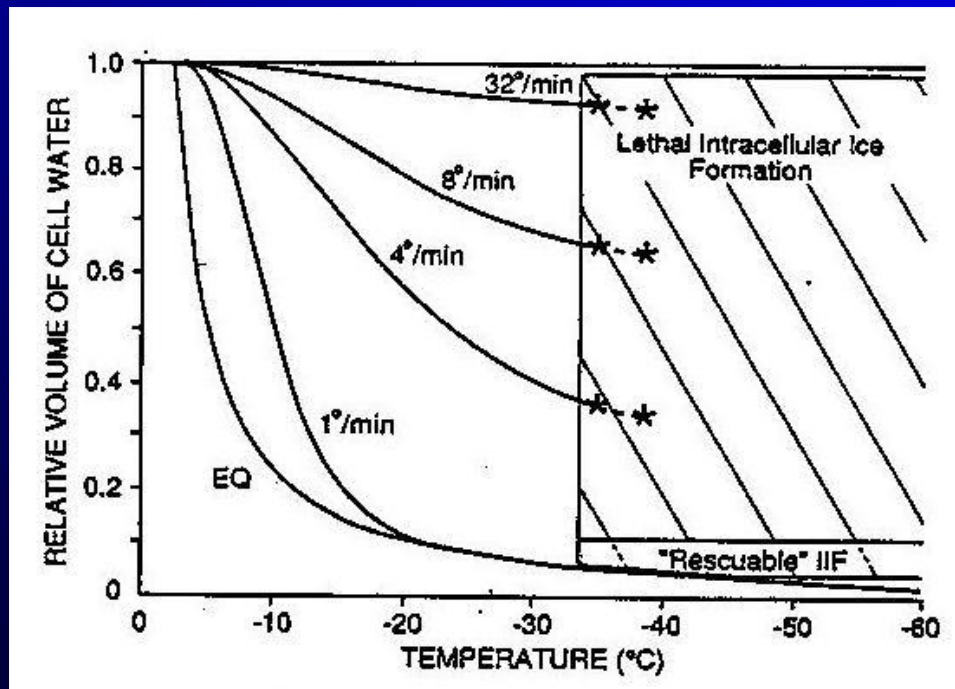
La "scienza" della Criobiologia, negli ultimi 50 anni, si è evoluta in parallelo alle tecniche di Fecondazione Assistita.

Negli ultimi anni sono stati fatti numerosi progressi nella comprensione dei principi biofisici implicati nella crioconservazione.

Introduzione

La termodinamica delle soluzioni acquose diluite regola la risposta delle cellule e dei tessuti al processo di congelamento.

La transizione di fase dell'acqua in ghiaccio è l'evento con il maggior impatto sulla sopravvivenza cellulare.



Mazur, 1990

Introduzione

CRIOPROTETTORI:

Sostanze fornite alle cellule prima del congelamento e che permettono una più alta sopravvivenza cellulare, dopo scongelamento, di quella ottenibile in loro assenza (Karow, 1974).

Vantaggi:

- *"Salt-buffering"*
- *Stabilizzazione delle membrane cellulari (Anchordoguy et al., 1987; Crowe et al., 1990)*
- *Protezione dai radicali liberi dell'ossigeno (Fleck et al, 2000)*

Svantaggi (tossicità)

- *Chimica (interazione con organelli cellulari es. microt. e microf.)*
- *Osmotica*

Tecniche attualmente in studio

- Congelamento frammenti tessuto corticale
- Congelamento ovaio intero

Congelamento frammenti di tessuto corticale

Metodica

- Frammenti di tessuto corticale di 1-2 mm di spessore e 5X5 mm di lato
- Congelamento lento/scongelamento rapido
- Reimpianto ortotropico o eterotropico

Congelamento frammenti di tessuto corticale

Prelievo chirurgico

- **Laparotomico**: ovaio intero/frammenti
- **Laparoscopico**: ovaio intero/frammenti

I frammenti vengono ulteriormente processati in laboratorio fino ad ottenere le dimensioni appropriate

Congelamento frammenti di tessuto corticale

Protocolli di congelamento lento/scongelamento rapido

Crioprotettori:

PrOH-saccarosio

(Hovatta et al 1996,
Debra A. Gook 2005)

DMSO

(Ramihi et al 2004)

Glicole etilenico - saccarosio

(Schmidt et al 2004)

Borini

Raffreddamento mediante curva di congelamento gestita da Dispositivo programmabile.

Congelamento frammenti di tessuto corticale

Reimpianto

Ortotropico:

Pro: ripristino funzione endocrina/riproduttiva fisiologica, IVF

Contro: Maggiori danni ischemici

Eterotropico:

Pro: ripristino funzione endocrina, più efficace rivascolarizzazione, minore danno ischemico

Contro: obbligo di IVF (stimolazione farmacologica)

N.B.: ad oggi la funzionalità del tessuto trapiantato si esaurisce nell'arco di circa 6 mesi.

Alternativa: I.V.M. (risultati??)

Congelamento ovaio intero

Metodica:

- prelievo laparoscopico/laparotomico
- perfusione dell'organo
- Congelamento lento/scongelamento rapido
- Reimpianto ortotopico/eterotopico

Congelamento ovaio intero

Prelievo chirurgico:

L'ovaio deve essere prelevato con la sua arteria intatta e della lunghezza di almeno 6 cm per permettere l'innesto al catetere di connessione alla pompa. Per ridurre ulteriormente l'ischemia l'ovaio deve essere rimosso tramite un endobag.

perfusione dell'organo:

Necessità di specialista microchirurgo in sala operatoria con
Strumentazione adeguata: stereomicroscopio, piano refrigerato, pompa
Precalibrata per la perfusione.

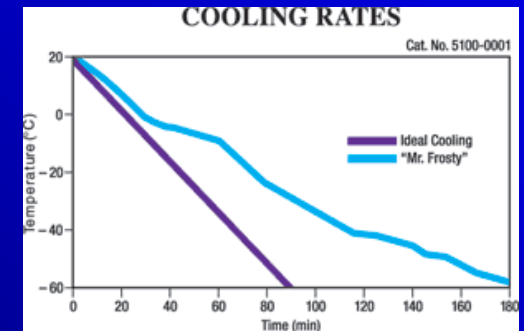
Congelamento ovaio intero

Congelamento lento/scongelamento rapido:

crioprotettori: HEPES-MEM, DMSO 10%, HSA
0,4% per 5 min a +4°C
in perfusione a 2,5 ml al min

Freezing container: 5100 cryo 1°C (Mr. Frosty)

Congelamento passivo in -80°C freezer per 24h,
poi azoto liquido -196°C)



Congelamento ovaio intero

Apparecchiature di integrazione sala operatoria-laboratorio:

Piano refrigerato

Apparato per microchirurgia

Frigido -80°C

Contenitori criogenici adeguati

Sistemi di allarme della banca

Adeguamento sterilità complessi operatori

Organizzazione reperibilità personale biologico

Terreni e materiale monouso

Strumentazione per preparazione terreni

Congelamento ovaio intero

Reimpianto

Ortotropico:

Pro: ripristino funzione endocrina/riproduttiva fisiologica, IVF

Contro: Maggiori danni ischemici/rischio trombotico post trapianto/

Eterotropico:

Pro: ripristino funzione endocrina, più efficace rivascolarizzazione, minore danno ischemico

Contro: obbligo di IVF (stimolazione farmacologica)

limitazioni.: difficoltà tecniche della procedura di anastomosi vascolare e legate alla crioconservazione di grossi organi

Conclusioni

Dalla letteratura si evince che le conoscenze nel campo della crioconservazione di tessuto ovarico/ovaio intero, pur se molto promettenti permangono a tutt'oggi sperimentali, infatti si riporta un solo nato vivo da conservazione di frammenti corticali ovarici (Donnez *et al.*, 2004) e nessuno da congelamento di ovaio intero.

Conclusioni

Dalla bibliografia si evince una ampia gamma di protocolli di laboratorio per la crioconservazione di frammenti di tessuto ovarico, molti dei quali sperimentali e, da quanto riportato in bibliografia, molto promettenti.

In un tale contesto risulta vantaggioso un confronto con autorevoli gruppi di lavoro che “sul campo” applicano tali protocolli e per ciascuno di essi hanno una traccia dei benefici/svantaggi della tecnica.

Department of Gynecology, Université Catholique de Louvain,
Brussels, Belgium

Centro di riferimento nella crioconservazione ovarica

