



**INDICAZIONI PER LA PRESERVAZIONE DELLA  
FERTILITA' FEMMINILE E MASCHILE  
IN AMBITO ONCOLOGICO**

-----  
**PROGRAMMA FERTISAVE**

**Gruppo di Studio Medicina Oncologica e Follow up**

**Coordinatori:** Irene Alabiso, Gianmauro Numico, Elisa Sperti

**A cura del sottogruppo:**

**"Fertilità, tumori in gravidanza, valutazione della sfera sessuale e relativi  
trattamenti"**

Sabrina Terzolo - Referente, Annarosa Sabrina Bucci, Elisa Sperti

*Con la preziosa collaborazione della dott.ssa Marta Sestero - Fisiopatologia della  
Riproduzione e PMA Presidio Sant'Anna Torino*

**Documento approvato dai Coordinatori del Gruppo di Studio**



## INTRODUZIONE

La corretta informazione sui rischi di infertilità collegati alla patologia oncologica e sulle strategie disponibili a ridurne l'incidenza deve essere fornita a tutti i pazienti non appena posta la diagnosi, anche se in fase di stadiazione e prima di iniziare le terapie antitumorali.

Il tasso di infertilità iatrogena è variabile e dipende da più fattori: classe, dose e posologia del farmaco impiegato, estensione e sede del campo di irradiazione, dose erogata e suo frazionamento, età e sesso del/la paziente, anamnesi di pregressi trattamenti per infertilità.

Nelle donne, la fertilità può essere compromessa da qualsiasi trattamento che riduca il numero dei follicoli primordiali, che colpisca l'equilibrio ormonale o che interferisca con il funzionamento delle ovaie, delle tube, dell'utero o della cervice.

Cambiamenti anatomici o della vascolarizzazione a carico delle strutture genitali (chirurgia e/o radioterapia) possono impedire il concepimento naturale e il successo della gravidanza anche in presenza di funzione ovarica conservata e richiedere l'ausilio di tecniche di riproduzione assistita.

Il counselling riproduttivo ai giovani pazienti oncologici andrebbe quindi proposto subito dopo la diagnosi di malattia oncologica, così da avere il tempo necessario per condividere le migliori strategie di preservazione della fertilità, che variano a seconda della prognosi oncologica e riproduttiva.

Già durante i primi accertamenti oncologici, è indicato eseguire un profilo ormonale di base e un dosaggio di AMH (ormone antimulleriano) a tutte le pazienti in età riproduttiva che devono sottoporsi a trattamenti potenzialmente gonadotossici sia per poter effettuare un più accurato counselling riproduttivo sia per valutare l'effetto della terapia sulla successiva fertilità.

La proposta di preservare la fertilità, in un momento così critico della vita, è accolta dai pazienti e dai familiari come uno "sguardo al futuro", come un vero e proprio "investimento di vita". Tale opportunità, infatti, si pone come una preziosa offerta in un contesto permeato da ansie e preoccupazioni relative alla propria salute e alla salvaguardia della stessa.



## **1. PRESERVAZIONE DELLA FERTILITA' MASCHILE**

La crioconservazione del liquido seminale viene consigliata come strategia di preservazione della fertilità in pazienti che si sottopongono ad un trattamento chirurgico e/o radio/chemioterapico.

Rientrano in questa categoria pazienti che necessitano correzione del varicocele di III-IV grado oppure affetti da neoplasie.

Per i pazienti oncologici è sempre preferibile effettuare la crioconservazione prima di qualsiasi tipo di terapia antitumorale o radioterapia.

Nel caso in cui la terapia per qualsivoglia motivo sia già iniziata va segnalato nella scheda del paziente.

La segretaria o il personale di laboratorio ricevono la prenotazione della crioconservazione che può essere effettuata sia telefonicamente che di persona.

**Tel. Laboratorio 011.3134228**

**Fax 011.3134150**

**E-mail: [laboratoriofiver@gmail.com](mailto:laboratoriofiver@gmail.com)**

**Per effettuare la crioconservazione del liquido seminale il paziente dovrà osservare un periodo di astinenza compreso tra i 3 e i 5 giorni e presentare la seguente documentazione:**

- 1. esami virologici non antecedenti i tre mesi relativi ad HBV (HbsAg,HBcAb), HCV, HIV 1/2;**
- 2. un documento d'identità in corso di validità**
- 3. un'impegnativa con indicazione di “crioconservazione di spermatozoi” (codice catalogo; 69.92. 7)**

Se possibile consegnare il foglio informativo (allegato 1) affinché il paziente abbia tutte le informazioni necessarie.

Il biologo si occuperà dell'analisi del campione seminale secondo le linee guida del WHO 2010 e successiva procedura di crioconservazione mediante apposito terreno di coltura miscelato con il volume di seminale da crioconservare.



Il campione viene aliquotato in paillettes successivamente stoccate in azoto liquido in appositi contenitori criogenici.

In seguito all'analisi del campione il personale di laboratorio informerà il paziente relativamente alla qualità del liquido seminale e alla possibilità di crioconservazione:

- nel caso in cui il campione non sia idoneo al congelamento verrà concordata una seconda raccolta secondo la disponibilità del paziente e compatibilmente con il periodo di astinenza necessario;
- se il campione invece è idoneo verrà fatto compilare e firmare un consenso informato e verrà illustrata la modalità di crioconservazione, la quantità di materiale sottoposto a congelamento e l'utilizzo che il paziente potrà fare in futuro del campione.

Una copia di tale consenso verrà allegata alla scheda del paziente.

Una volta all'anno è richiesto al paziente di:

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

## **2. PRESERVAZIONE DELLA FERTILITA' FEMMINILE**

Le pazienti vengono inviate, previo contatto presso gli ambulatori:

- “Mamme oltre il tumore” tel **011 313 4576** (ore 11.00-12.30 e 14.00 – 15.00)
- l'ambulatorio di PMA **011 313 4411** (ore 10.30 – 15.00)

o tramite contatto e-mail [progettofertisave@yahoo.it](mailto:progettofertisave@yahoo.it)

La prima visita viene garantita entro le 72 ore dal primo contatto.

Saranno necessarie le impegnative per:

- visita ginecologica
- ecografia transvaginale



Se possibile, consegnare l'opuscolo informativo presente sul sito di Rete (allegati n° 2 e 3) affinché la paziente abbia tutte le informazioni necessarie in previsione del colloquio e della firma dei consensi informati .

## **2.1 Criteri di accesso al servizio**

### **Criteri di inclusione:**

- età < 40 anni (38 anni per crioconservazione di tessuto ovarico)
- buona prognosi (> 50% di chance di sopravvivenza a lungo termine)
- buona probabilità di mantenere una funzione uterina normale

### **Indicazioni**

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

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



## **2.2 Primo colloquio FERTISAVE**

Il counselling richiede un approccio multidisciplinare e una comunicazione efficace fra oncologo e medico della riproduzione.

Durante il counselling va indagato l'interesse del paziente ad una futura gravidanza e maternità. Va dunque stimato il rischio di infertilità del trattamento proposto e la prognosi oncologica.

Se il paziente è interessato e ne ha l'indicazione, vanno illustrate le diverse metodiche disponibili sia di criopreservazione (gameti e tessuto) sia di riduzione farmacologica della tossicità gonadica.

## **2.3 Tecniche di preservazione della fertilità femminile**

Le principali tecniche di preservazione della fertilità, standard e sperimentali, nelle giovani pazienti oncologiche sono rappresentate da:

- a) trasposizione ovarica,
- b) chirurgia conservativa,
- c) criopreservazione di embrioni o ovociti,
- d) soppressione gonadica con LHRH analoghi e criopreservazione di tessuto ovarico.

### **a) Trasposizione ovarica**

La trasposizione ovarica deve essere proposta a tutte le giovani donne candidate a irradiazione pelvica: il tasso di successo di questa tecnica, valutato come preservazione della funzione mestruale a breve termine, varia dal 33% al 91% a seconda delle casistiche (LG AIOM 2017) .

Candidate:

- pazienti che devono essere sottoposte a irradiazione pelvica

Tecnica:

la trasposizione ovarica consiste nello spostare chirurgicamente le ovaie il più lontano possibile dal campo di irradiazione.

I principali tumori che richiedono la trasposizione ovarica nelle pazienti adulte sono il tumore della cervice e del retto, pertanto nella maggior parte dei casi le ovaie devono esser spostate lateralmente e in alto. La procedura può essere effettuata per via laparoscopica se una laparotomia non è necessaria per il trattamento primario della neoplasia.



## **b) Chirurgia conservativa**

Una terapia conservativa nei tumori ginecologici (cervice, ovaio e endometrio), è proponibile in casi selezionati a buona prognosi solo nelle seguenti circostanze:

- Possibilità di eseguire una accurata e completa stadiazione e selezione dei casi;
- Pazienti in età riproduttiva desiderose di concepimento, molto motivate e disponibili a uno stretto follow-up;

## **c) Crioconservazione ovocitaria**

La crioconservazione ovocitaria è una tecnica consolidata e rappresenta un'importante strategia di preservazione della fertilità.

Deve essere proposta a tutte le pazienti che hanno la possibilità di rinviare il trattamento di 2-3 settimane e che hanno una riserva ovarica adeguata, dopo il menarca ed entro i 40 anni.

### **Esami richiesti per la procedura:**

- **esami ematochimici necessari alla crioconservazione (HbsAg, HbcAb, HIV, HCV)**
- **ECG**
- **ormone antimulleriano - AMH (se non a disposizione)**

### **Descrizione della procedura**

Sulla base dell'ecografia ovarica e dell'ultima mestruazione verrà impostato il protocollo di stimolazione.

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

In primo luogo è necessaria l'induzione di una superovulazione mediante l'uso di farmaci comunemente utilizzati nei cicli di fecondazione in vitro (gonadotropine e analoghi del GnRH); questi farmaci comportano la crescita contemporanea di più follicoli contenenti gli ovociti.

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

La stimolazione ovarica dura all'incirca 10-15 giorni. Durante la stimolazione è necessario effettuare un monitoraggio ecografico e biochimico della crescita follicolare, pertanto le pazienti



devono recarsi presso l'Ambulatorio per effettuare prelievi di sangue e controlli ultrasonografici a giorni alterni per circa 3-4 volte.

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

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

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

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

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

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

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

- Ovocita Immaturo: GV (Vescicola Germinale – stadio di Profase I); M I (stadio di Metafase I).
- Ovocita Maturo: M II ( stadio di Metafase II ).

Gli ovociti in Metafase II sono ovociti in stadio maturativo idoneo alla fecondazione in vitro.

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

Gli ovociti MII così ottenuti vengono crioconservati mediante la tecnica di Vittrificazione che prevede una breve esposizione degli ovociti a temperature critiche con un'elevata concentrazione di crioprotettori.

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



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

La Vitrificazione, metodica attualmente in uso nel nostro laboratorio è, ad oggi, la tecnica di elezione per la crioconservazione di ovociti e presenta percentuali di sopravvivenza superiori al 90%.

In seguito ai dati incoraggianti ottenuti grazie alla vitrificazione, la Società Americana di Medicina della Riproduzione (ASRM) durante il Congresso annuale del 2012 ha dichiarato che la Vitrificazione degli ovociti non deve più essere considerata una tecnica sperimentale bensì una tecnica consolidata.

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

Una volta all'anno è richiesto al paziente di:

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

#### **d) Gonadoprotezione con analoghi del GnRH**

Il rationale dell'utilizzo degli LHRH analoghi (triptorelin, goserelin, leuprolide) allo scopo di ridurre la tossicità ovarica della chemioterapia, è basato sull'osservazione che la chemioterapia colpisce maggiormente i tessuti con rapido turn-over cellulare e che, pertanto, uno stato indotto di inibizione dell'attività ovarica durante la terapia antitumorale potrebbe proteggere le ovaie stesse dall'effetto della chemioterapia.

La somministrazione cronica di LHRH analoghi, riducendo la secrezione di FSH, sopprime la funzione ovarica e potrebbe, quindi, ridurre l'effetto tossico della chemioterapia.

La somministrazione di LHRH analoghi può essere eseguita contestualmente alla chemioterapia in qualsiasi ospedale oncologico, non comporta elevati livelli estrogenici (se non nella fase successiva alla prima somministrazione) e non necessita né una stimolazione ovarica né interventi chirurgici, con i possibili rinvii della terapia oncologica.

La prima somministrazione di analoghi deve essere eseguita circa 7-15 giorni prima dell'inizio della chemioterapia, ogni 28 giorni, fino al mese successivo la fine della chemioterapia.

La prescrizione è soggetta a piano terapeutico.

Durante il primo colloquio il medico deve spiegare che la somministrazione di LHRH analoghi può essere associata a sintomi da deprivazione estrogenica, comprese vampate di calore, secchezza vaginale, alterazione del tono dell'umore. Tali sintomi sono reversibili alla sospensione del trattamento. Le alterazioni del metabolismo osseo non sono di solito clinicamente significative per somministrazioni inferiori a 6 mesi, ma è utile un monitoraggio della massa ossea in pazienti che ricevono il trattamento per periodi più prolungati.

La soppressione ovarica con LHRH analoghi durante la chemioterapia e le strategie di crioconservazione possono essere usate insieme per aumentare la possibilità di preservare la funzione ovarica e la fertilità in giovani donne con malattia neoplastica candidate a ricevere chemioterapia.

#### **e) Crioconservazione corticale ovarica**

La crioconservazione di tessuto ovarico rappresenta l'unica tecnica attuabile per le pazienti prepuberi.

#### Criteri di inclusione:

- età > 3 anni e < 39 anni
- buona chance di sopravvivenza a lungo termine

#### **Protocollo sperimentale**

Il protocollo qui illustrato prevede che, nel caso di pazienti selezionate, si proceda a congelare e conservare per lungo tempo frammenti di corticale ovarica. Le procedure descritte in questo

protocollo sono sperimentali e sebbene la ricerca in questo campo sia molto attiva è probabile che ci voglia del tempo prima che esse siano applicabili di routine.

Nella specie umana, a tutto il 2017 sono state riportate più di 100 gravidanze ottenute sia mediante concepimento spontaneo sia mediante fecondazione in vitro dopo trapianto autologo di tessuto ovarico crioconservato, ma non esiste nessuna garanzia sul fatto che le tecniche proposte in questo protocollo siano effettivamente efficaci nel preservare la fertilità della donna. L'induzione della pubertà grazie a trapianto di tessuto prelevato e congelato in pazienti prepuberi è stata dimostrata da Poirot e da Ernst e nel 2015 il gruppo belga di Isabelle Demeestere ha descritto la prima gravidanza ottenuta grazie a un tessuto congelato prima della pubertà.

I frammenti ovarici si possono prelevare durante un intervento laparoscopico, in anestesia generale. La biopsia laparoscopica di corticale ovarica può essere programmata in qualsiasi fase del ciclo mestruale ed è organizzabile in pochi giorni.

La procedura di prelievo dei frammenti ovarici può essere effettuata presso il Reparto di Ostetricia e Ginecologia I dell'Ospedale Sant'Anna.

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

La biopsia di corticale ovarica della paziente viene posizionata in un terreno di coltura tamponato e trasportata, in ghiaccio non secco, dalla sala operatoria al laboratorio FIVER del nostro centro.

Qualora il prelievo venisse eseguito da entrambe le ovaie è necessario tenere separate le biopsie per tutto il processo di congelamento.

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



Al momento del congelamento uno o due frammenti di corticale ovarica vengono inviati all'Anatomia Patologica per la valutazione della conta follicolare (follicoli/mm<sup>2</sup>) e, quando possibile, per la ricerca dei marker tumorali.

Il congelamento può avvenire mediante congelamento lento.

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

1. una relazione di laboratorio in cui verranno fornite le informazioni relative al tessuto crioconservato;
2. una copia del referto dell'esame istologico.

Una volta all'anno è richiesto al paziente di:

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

### **Aspetti psicologici: significato e vissuti legati alla preservazione della fertilità**

Considerato il particolare momento di vita, in cui il Progetto Fertisave viene proposto, possono presentarsi delle criticità che rendono più difficile la scelta di aderirvi o meno per le donne e/o per i loro genitori.

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

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



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

## Bibliografia

1. Donnez J, Dolmans MM. Transplantation of ovarian tissue. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2014 Nov;28(8):1188-97.
2. Akar ME, Carrillo AJ, Jennell JL, Yalcinkaya TM. Robotic-assisted laparoscopic ovarian tissue transplantation. *Fertil Steril* 2011 Mar 1;95(3):1120 e5-8.
3. Oktay K. Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection? *Hum Reprod* 2006 Jun;21(6):1345-8.
4. Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Laila JM, Balasch J. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Sep;86(9):4489-94.
5. Kim SS, Hwang IT, Lee HC. Heterotopic autotransplantation of cryobanked human ovarian tissue as a strategy to restore ovarian function. *Fertil Steril* 2004 Oct;82(4):930-2.
6. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004 Oct 16-22;364(9443):1405-10.
7. Almodin CG, Minguetti-Câmara VC, Meister H, Ceschin AP, Kriger E, Ferreira JO. Recovery of natural fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in ewes subjected to radiotherapy. *Fertil Steril* 2004 Jan;81(1):160-4.
8. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report. *Hum Reprod* 2006 Jan;21(1):183-8.
9. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease. *Oncologist* 2007 Dec;12(12):1437-42.
10. Roux C, Amiot C, Agnani G, Aubard Y, Rohrlich PS, Piver P. Live birth after ovarian tissue autograft in a patient with sickle cell disease treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Fertil Steril* 2010 May 1;93(7):2413 e15-9.

11. Dittrich R, Lotz L, Keck G, Hoffmann I, Mueller A, Beckmann MW, et al. Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. *Fertil Steril* 2012 Feb;97(2):387-90.
12. Sanchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escriba MJ, Simon C, et al. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril* 2010 Jan;93(1):268 e11-3.
13. Tanbo T, Greggains G, Storeng R, Busund B, Langebrekke A, Fedorcsak P. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue after treatment for malignant disease - the first Norwegian results. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015 Sep;94(9):937-41.
14. Meirou D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 2005 Jul 21;353(3):318-21.
15. Silber SJ. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. *Mol Hum Reprod* 2012 Feb;18(2):59-67.
16. Rodriguez-Wallberg KA, Karlstrom PO, Rezapour M, Castellanos E, Hreinsson J, Rasmussen C, et al. Full-term newborn after repeated ovarian tissue transplants in a patient treated for Ewing sarcoma by sterilizing pelvic irradiation and chemotherapy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2015 Mar;94(3):324-8.
17. Revelli A, Marchino G, Dolfen E, Molinari E, Delle Piane L, Salvagno F, et al. Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy. *Fertil Steril* 2013 Jan;99(1):227-30.
18. Meirou D, Roness H, Kristensen SG, Andersen CY. Optimizing outcomes from ovarian tissue cryopreservation and transplantation; activation versus preservation. *Hum Reprod* 2015 Nov;30(11):2453-6.
19. Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P, Andersen CY. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *J Assist Reprod Genet* 2017 Mar;34(3):325-36.

20. Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet* 2015 Aug;32(8):1167-70.
21. Meirou D, Ra'anani H, Shapira M, Brenghausen M, Derech Chaim S, Aviel-Ronen S, et al. Transplantations of frozen-thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria. *Fertil Steril* 2016 08;106(2):467-74.
22. Donnez J, Dolmans MM, Diaz C, Pellicer A. Ovarian cortex transplantation: time to move on from experimental studies to open clinical application. *Fertil Steril* 2015 Nov;104(5):1097-8.
23. Van der Ven H, Liebenthron J, Beckmann M, Toth B, Korell M, Krüssel J, et al. Ninety-five orthotopic transplantations in 74 women of ovarian tissue after cytotoxic treatment in a fertility preservation network: tissue activity, pregnancy and delivery rates. *Hum Reprod* 2016 09;31(9):2031-41.
24. Ernst E, Kjærsgaard M, Birkebæk NH, Clausen N, Andersen CY. Case report: stimulation of puberty in a girl with chemo- and radiation therapy induced ovarian failure by transplantation of a small part of her frozen/thawed ovarian tissue. *Eur J Cancer* 2013 Mar;49(4):911-4.
25. Dolmans MM, Luyckx V, Donnez J, Andersen CY, Greve T. Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertil Steril* 2013 May;99(6):1514-22.
26. McLaughlin M, Albertini DF, Wallace WHB, Anderson RA, Telfer EE. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Mol Hum Reprod* 2018 Mar;24(3):135-42.
27. Amorim CA, Shikanov A. The artificial ovary: current status and future perspectives. *Future Oncol* 2016 Oct;12(20):2323-32.
28. Soares M, Sahrari K, Amorim CA, Saussoy P, Donnez J, Dolmans MM. Evaluation of a human ovarian follicle isolation technique to obtain disease-free follicle suspensions before safely grafting to cancer patients. *Fertil Steril* 2015 Sep;104(3):672-80 e2.
29. Dittrich R, Lotz L, Fehm T, Krüssel J, von Wolff M, Toth B, et al. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue--a systematic review of MII oocyte maturation and discussion of it as a realistic option for restoring fertility after cancer treatment. *Fertil Steril* 2015 Jun;103(6):1557-65

