

# **Sicurezza nella crioconservazione di cellule e tessuti umani e scenari futuri del biobanking**

Dr. Lodovico Parmegiani, PhD



**Next Fertility**  
GynePro

# Affiliation and Disclosures

---

## Lodovico Parmegiani

- Head of Embryology, NextClinics International
- Director, IVF Laboratory Next Fertility GynePro, Bologna-Italy
- Founder and shareholder of:
  - Nterilizer, Italy
- reports fees during 2023 from:
  - Coopersurgical, USA
  - Biopsybell, Italy



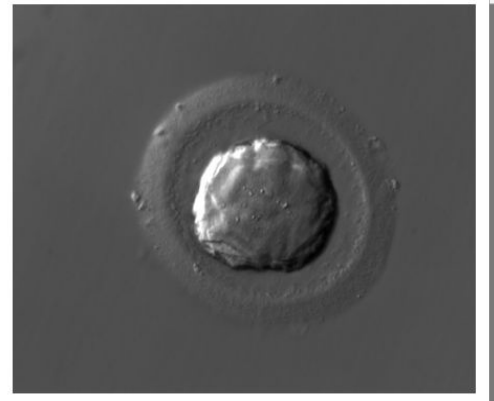
**Efficienza:**  
**dal congelamento**  
**lento alla**  
**vitrificazione**



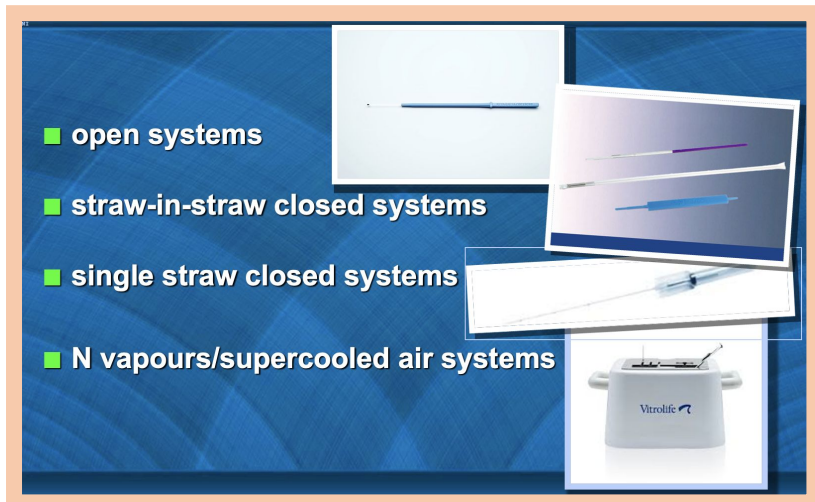
**Next Fertility**  
GynePro

# Vitrificazione

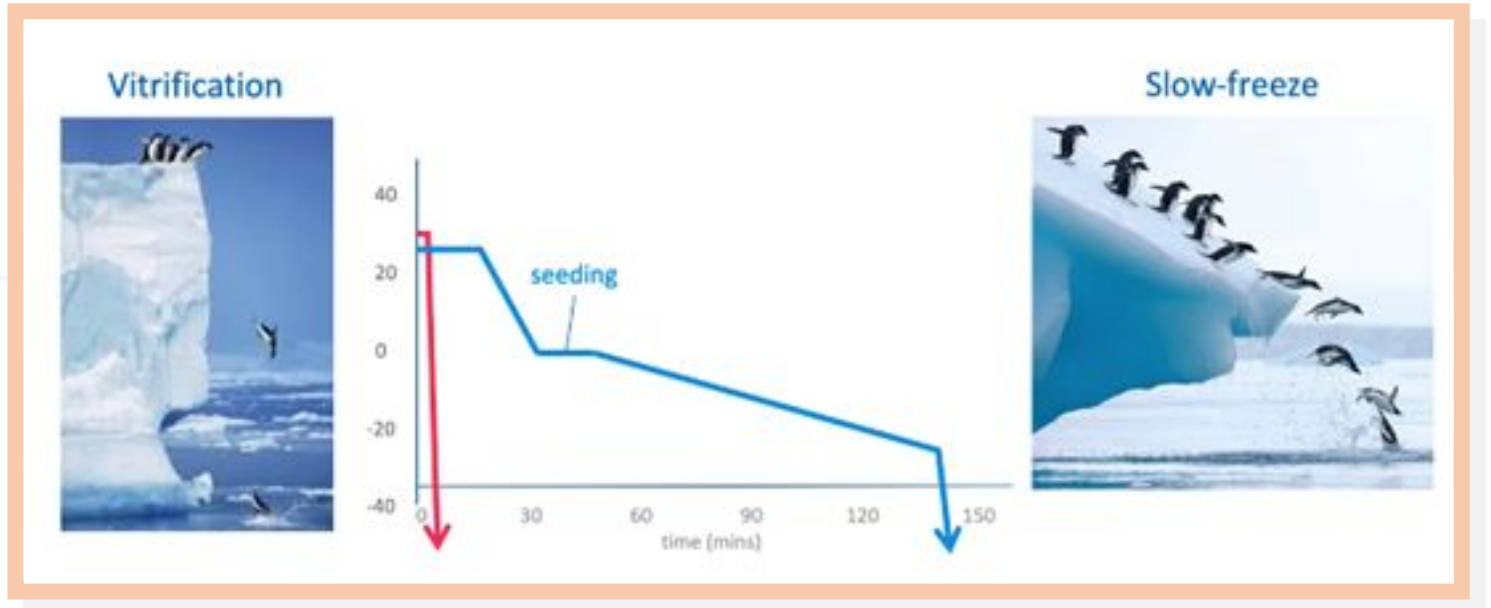
Luyet, *Biodynamica* 1937,1:1-14 ; Leibo et al, *Cryobiology* 1978,15:257-71; Mazur et al, *Cryobiology* 2005,51:29-53



- Conversione di un liquido super viscoso in uno stato vetroso quando viene raffreddato al di sotto della sua temperatura di transizione vetrosa. **Per evitare la formazione di cristalli di ghiaccio!**
  - *Fahy et al, Cryobiology 1987,24:196-13*
- Qualsiasi materiale può vitrificare, in base a:
  - **viscosità, velocità di raffreddamento e volume del campione**
  - *Yavin e Arav, Theriogenology 2007,67:81-9; Vajta e Kuwayama, Theriogenology 2006,65:236-44*
- La vitrificazione delle cellule riproduttive umane **avviene per immersione diretta in azoto liquido** ed è incredibilmente efficiente: viene eseguita con specifici «carriers»
  - Sopravvivenza: **99%** embrioni – **90%** ovociti
    - *Kuwayama et al, RBMO 2005*



# Slow freezing



GYNEPRO

## Intracellular glassy state

### ❑ vitrification (VIT)

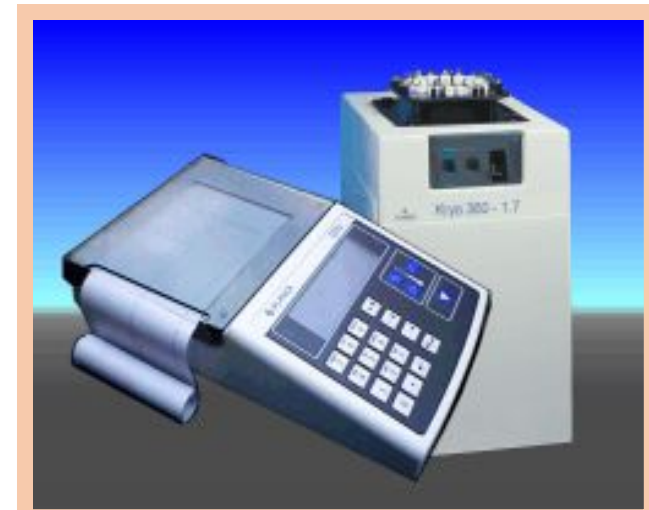
- ❑ viscous medium with high CP concentration
- ❑ *Rall and Fahy, Nature 1985,313:573-75*

### ❑ slow freezing (SF)

- ❑ throughout cooling procedure
- ❑ permeation of icCPs as ice-crystals form in cryopreservation solution
- ❑ *Vanderzwalmen et al, Hum Reprod 2013,28:2101-10*

### ❑ slow freezing = vitrification

- ❑ intracellular vitrification with ice in extracellular compartment
- ❑ *Katkov et al, Current Frontiers in Cryobiology 2012,3-40*



# Efficienza Slow Freezing - 2012

Table 3 Embryo key performance indicator values.

| KPI |  | Competence  |     | Benchmark  |
|-----|--|---|-----|--|
| E1  | Morphological survival: fully intact   | Freezing  | 40% | 55%  |
|     |  | Vitrification   | 70% | 85%  |
| E2  | Morphological survival: $\geq 50\%$ intact                                   | Freezing  | 60% | 85%  |
|     |  | Vitrification   | 85% | 95%  |
| E3  | Post-thaw development (including implantation rate) for fully intact embryos | $\leq 10\%$ (relative) lower than that for the comparable population of fresh embryos at the centre |     | The same as for the comparable population of fresh embryos at the centre |

The KPI values are calculated as the proportion of all thawed/warmed embryos.

# La vitrificazione diventa *Gold Standard*

**Table 4 – Key performance indicators.**

| Key performance indicator                         | Calculation   | Competency value | Benchmark value |
|---|---|------------------|-----------------|
| ICSI damage rate                                  | $\frac{\text{no. damaged or degenerated}}{\text{all oocytes injected}} \times 100$                    | ≤10%             | ≤5%             |
| ICSI normal fertilization rate                    | $\frac{\text{no. oocytes with 2PN and 2PB}}{\text{no. MII oocytes injected}} \times 100$              | ≥65%             | ≥80%            |
| IVF normal fertilization rate                     | $\frac{\text{no. oocytes with 2PN and 2PB}}{\text{no. COC inseminated}} \times 100$                   | ≥60%             | ≥75%            |
| Failed fertilization rate (IVF)                   | $\frac{\text{no. cycles with no evidence of fert}^n}{\text{no. of stimulated IVF cycles}} \times 100$ |                  | <5%             |
| Cleavage rate                                     | $\frac{\text{no. cleaved embryos on Day 2}}{\text{no. 2PN/2PB oocytes on Day 1}} \times 100$          | ≥95%             | ≥99%            |
| Day 2 embryo development rate                     | $\frac{\text{no. 4-cell embryos on Day 2}}{\text{no. normally fertilized oocytes}^a} \times 100$      | ≥50%             | ≥80%            |
| Day 3 embryo development rate                     | $\frac{\text{no. 8-cell embryos on Day 3}}{\text{no. normally fertilized oocytes}^a} \times 100$      | ≥45%             | ≥70%            |
| Blastocyst development rate                       | $\frac{\text{no. blastocysts Day 5}}{\text{no. normally fertilized oocytes}^a} \times 100$            | ≥40%             | ≥60%            |
| Successful biopsy rate                            | $\frac{\text{no. biopsies with DNA detected}}{\text{no. biopsies performed}} \times 100$              | ≥90%             | ≥95%            |
| Blastocyst cryosurvival rate                      | $\frac{\text{no. blastocysts appearing intact}}{\text{no. blastocysts warmed}} \times 100$            | ≥90%             | ≥99%            |
| Implantation rate (cleavage stage) <sup>b</sup>   | $\frac{\text{no. sacs seen on ultrasound}^c}{\text{no. embryos transferred}} \times 100$              | ≥25%             | ≥33%            |
| Implantation rate (blastocyst stage) <sup>b</sup> | $\frac{\text{no. sacs seen on ultrasound}^c}{\text{no. blastocysts transferred}} \times 100$          | ≥35%             | ≥60%            |

ICSI = intracytoplasmic sperm injection; MII = metaphase II; PB = polar body; PN = pronucleus.  
<sup>a</sup> Defined as oocytes with 2PN and 2PB on Day 1.  
<sup>b</sup> Based on total number of embryos transferred to all patients in the reference group, not just to those for whom an implantation occurred.  
<sup>c</sup> Definition reached after discussion, as some felt that no. fetal heartbeat detected/no. embryos transferred was a more meaningful Indicator.

# Impatto della vitrificazione per immersione diretta in azoto liquido nella PMA

---

- **Gold Standard da almeno 10 anni**
- ha permesso di:
  - congelare in modo efficiente gli ovociti
  - favorire la movimentazione delle cellule congelate al posto dei pazienti
  - **raddoppiare** la sopravvivenza allo scongelamento degli embrioni
    - circa 3 milioni di bambini nel mondo sono nati da embrioni criopreservati, **si può stimare che quasi 1 milione di bimbi non sarebbe nato se fossimo rimasti allo Slow Freezing!**





**Sicurezza:**  
**Vitrificazione**  
**Personalizzata**  
**Virus-Free**  
**Blockchain**

# Azoto Liquido – (Liquid Nitrogen - LN<sub>2</sub>)



*Tedder et al, Lancet 1995. Morris, Cryobiology 2005. Borges et al, JARG 2020.*

## Agente criogenico per il raffreddamento e il congelamento nel Food & Beverage, Healthcare

- LN<sub>2</sub> si può contaminare: sono stati trovati contaminanti nelle criobanche contenenti cellule e tessuti
  - virus, batteri, funghi
- la contaminazione crea rischi per i campioni biologici, i pazienti e gli operatori
  - Nel 1995, 6 pazienti sono state infettate da HBV in seguito a trapianto di midollo osseo e staminali del sangue contaminati da LN<sub>2</sub> in una criobanca
- Alcune applicazioni richiedono LN<sub>2</sub> sterile
  - Procreazione Medicalmente Assistita (PMA)
  - Vitirificazione, riscaldamento e crioconservazione
  - Costo della contaminazione nella PMA: 100 milioni USD/anno

# Dove mangeresti il gelato?

---



# E allora perché si usano queste scatole per la vitrificazione?

---



# Rischio di infezione

*Parmegiani, Fertil Steril 2011. Pomeroy et al, Fertil Steril 2009. Parmegiani, Hum Reprod 2020.*

thebmj

covid-19

Research ▾

Education ▾

Re: Covid-19: Airborne transmission is being underestimated, and Covid-19 in Liquid Nitrogen is a potential threat

Human assisted reproductive technology (ART) is the only medical discipline where human gametes and embryos with potential to produce live births are routinely stored in LN<sub>2</sub>/NV. Many embryo/oocyte cryopreservation techniques utilize “open” cryo-devices with direct contact with LN<sub>2</sub>/NV during cooling. Even with “closed” systems, accidental contact with LN<sub>2</sub>/NV may occur during storage and warming of material. The fact that infections traceable to cryostorage have not been reported after millions of embryo transfers may be due to innate immunity in the female reproductive tract and reduced dosage of infective agents during laboratory procedures. However, the risk of infection is real, especially when new, highly infective agents arise. Airborne contaminants come in contact with LN<sub>2</sub>/NV and remain cryopreserved [3]. Although some industrial sectors (drug manufacturing, food and beverage sterile packaging) carry out raw filtration of LN<sub>2</sub> before use, this does not guarantee sterility, and it is not effective against smaller microorganisms.

*Parmegiani, Vajta and Alikani - British Medicine Journal 2020*

## Contaminazione mediata da azoto liquido

- Anche con sistemi “chiusi”, durante lo stoccaggio e il riscaldamento del materiale può verificarsi un contatto accidentale con LN<sub>2</sub>/NV
- Il vero rischio non è legato ai sistemi di vitrificazione, ma all'azoto liquido e ai vapori di azoto (LN<sub>2</sub>/NV) stessi. Una scatola con 2 litri di LN<sub>2</sub> può contaminare piani di lavoro, operatori, cellule e pazienti

# Manipolazione e trasporto di cellule/tessuti riproduttivi

Parmegiani et al, Current Trends in Clinical Embryology 2017

van Doremalen et al, NEJM 2020; Burke et al, J Dermatol Surg Oncol 1986.

van der Hoek et al, Plos One Medicine 2005

L. Parmegiani et al.

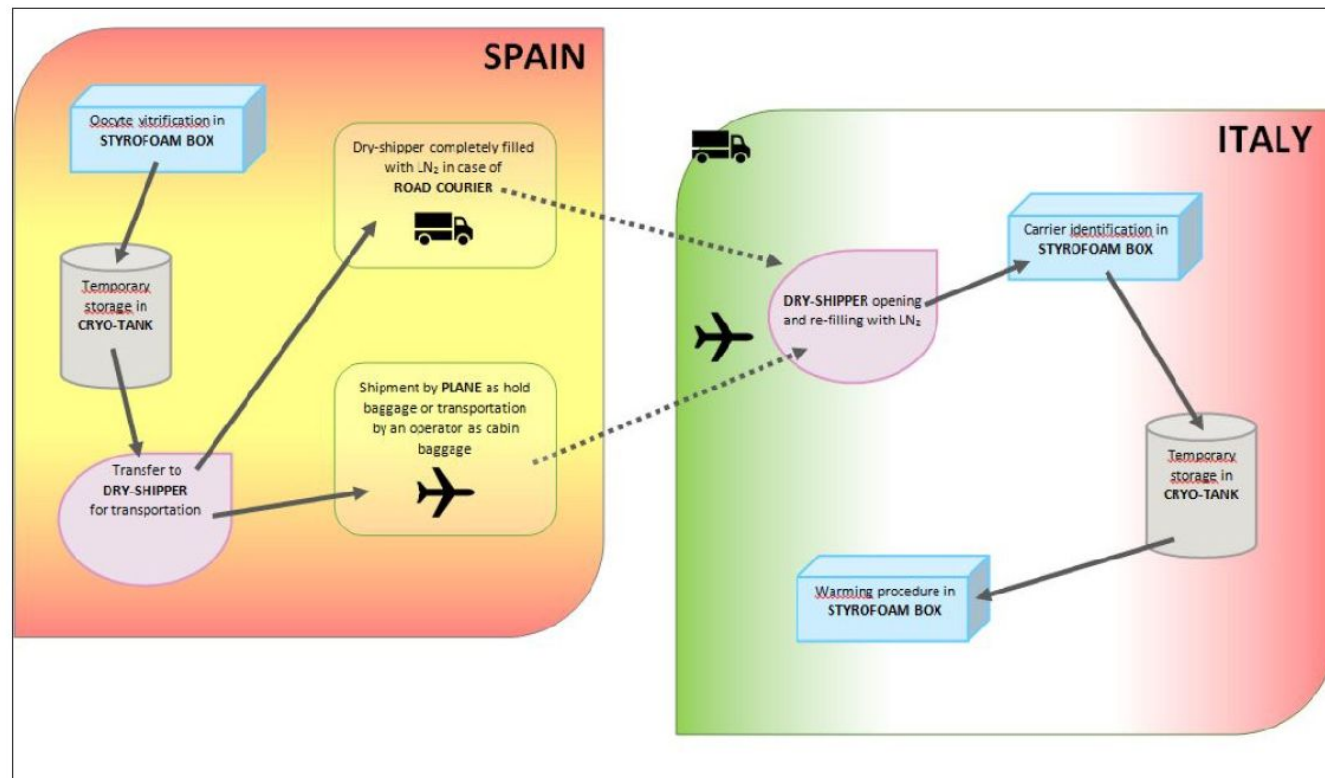
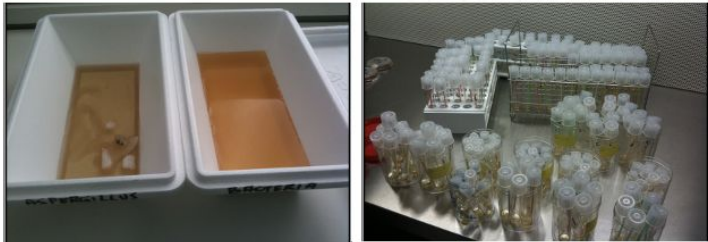


Figure 1 - Oocyte handling for transportation and warming.

## Covid-19 ed altri virus in LN<sub>2</sub>/NV: una potenziale bomba a orologeria?

- I contaminanti trasportati dall'aria entrano in contatto con LN<sub>2</sub>/NV e rimangono crioconservati
- L'uso di LN<sub>2</sub>/NV contaminati rischia il risveglio del virus e la contaminazione delle cellule in scongelamento, dell'ambiente e degli operatori

# Sterilizzazione LN<sub>2</sub>/NV Lavaggio Carriers con LN<sub>2</sub> sterile



Contaminants in Liquid Nitrogen. Parmegiani, Fertil Steril 2012

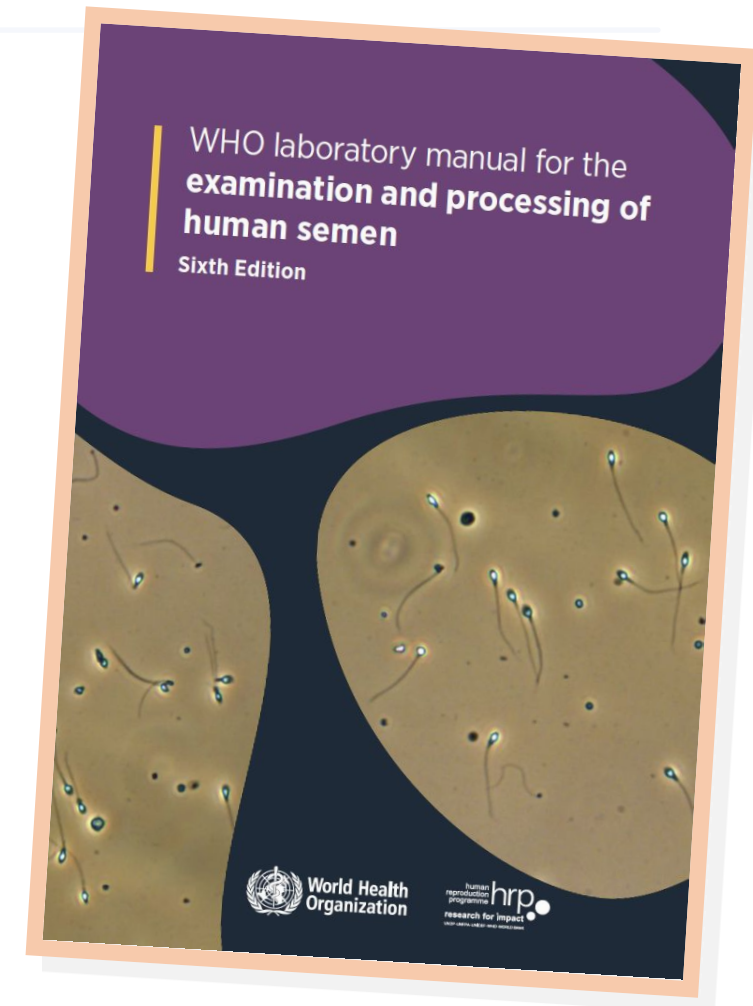
**A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN<sub>2</sub>)**

- La **luce ultravioletta UV-C** sterilizza LN<sub>2</sub> da qualsiasi contaminante
- HIV, Epatite, Coronavirus, etc (EG epatite : 8,000 UV  $\mu$ Ws/cm<sup>2</sup>)
  - *Parmegiani et al, Hum Reprod 2009; Darnell et al Transfusion 2006*
- E' possibile sterilizzare facilmente piccole quantità di LN<sub>2</sub> prima dell'uso. per eseguire la vitrificazione in modo asettico
  - *Parmegiani et al, RBMO 2010 -2011; Parmegiani and Rienzi, Hum Reprod 2011*
- Un lavaggio delle cellule con LN<sub>2</sub> sterile prima dello scongelamento riduce il rischio di contaminazione. La certificazione del lotto sterile di LN<sub>2</sub> utilizzato per la procedura di lavaggio è una traccia attendibile per
  - Sistema Gestione Qualità / legislazioni stringenti
    - *Parmegiani et al, Fertil Steril 2012*

# Raccomandazioni – Linee guida

Recentemente molti autori hanno suggerito di implementare pratiche di "good manufacturing" nella PMA tra cui:

- **L'utilizzo di contenitori di vitrificazione personalizzati monouso**
  - *Maggiulli et al., RBMO 2020*
- **La sterilizzazione di LN<sub>2</sub> prima dell'uso**
  - *Arav et al., JARG 2020; Alteri et al., Hum Reprod 2020*
- **Il lavaggio dei campioni crioconservati con LN<sub>2</sub> sterile prima dello scongelamento**
  - *Hickman et al., RBMO 2020; Shapiro et al., RBMO 2020*
- **Precauzioni per un uso sicuro di LN<sub>2</sub>**
  - *Pomeroy and Schiewe, JARG 2020; Scarica et al JARG 2021; Vajta et al Hum Reprod 2022*
- **Anche il WHO suggerisce la sterilizzazione di LN<sub>2</sub> e la decontaminazione dei campioni crioconservati prima dello scongelamento**
  - *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - Sixth edition 2021*



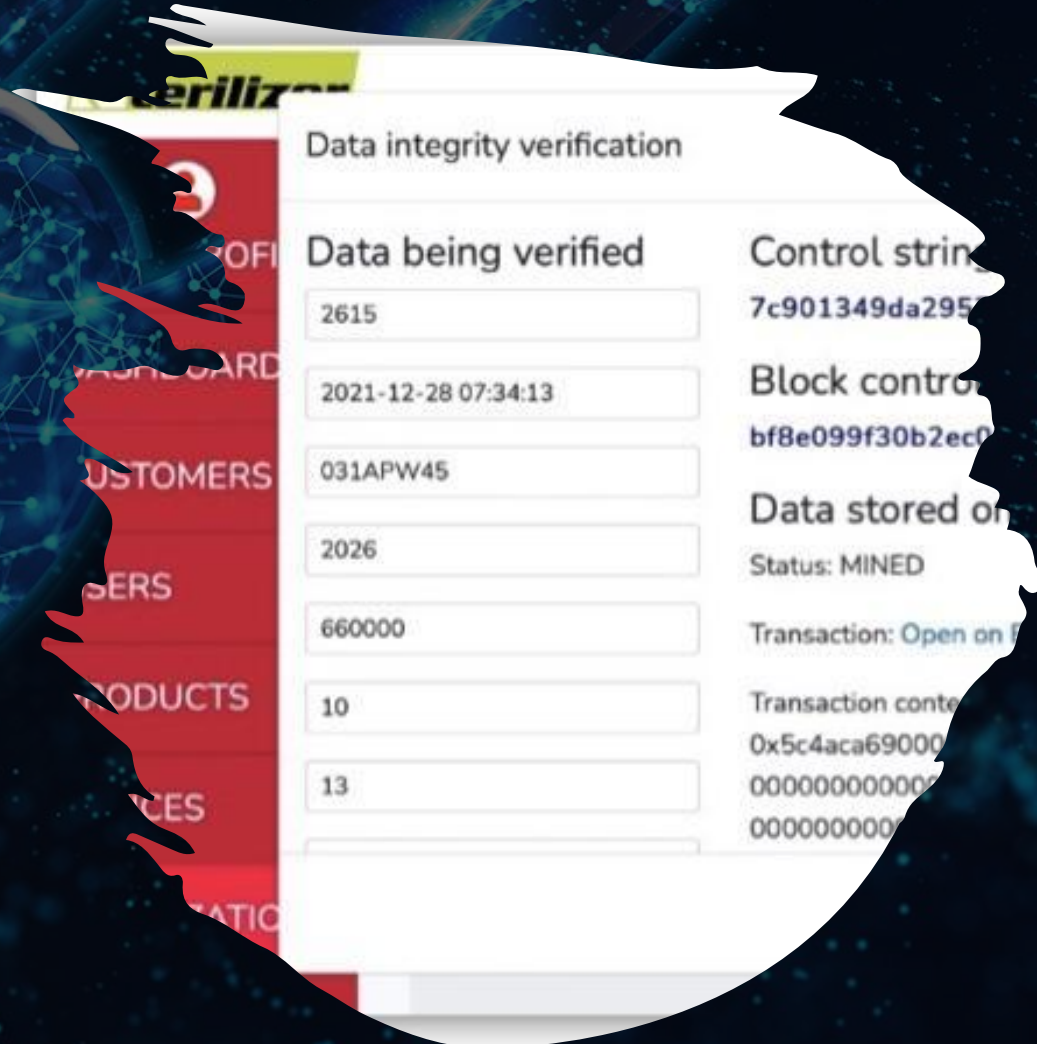




# Blockchain

- La Blockchain sfrutta le caratteristiche di una rete informatica di nodi e consente di gestire e aggiornare, in modo univoco e sicuro, un registro contenente dati e informazioni in maniera aperta, condivisa e distribuita senza la necessità di un'entità centrale di controllo e verifica.

- Nel settore sanitario, la Blockchain può diventare uno strumento per affrontare le sfide relative alla condivisione di dati sensibili e alla tracciabilità delle procedure mediche e di laboratorio.



# Vitrificazione Personalizzata Virus-Free Blockchain

Ad oggi, dall'inizio della pandemia presso il nostro centro Next Fertility GynePro sono già nati più di **500** bambini da cellule congelate con tecnologia Blockchain Virus-Free

La tecnologia si sta diffondendo in tutto il mondo!



Sanità

## All'ospedale di Lagosanto la conservazione degli embrioni è "virus-free"

Il Delta è il primo centro pubblico in Italia a usare la nuova tecnica che sterilizza l'azoto impiegato nella procreazione assistita

Everything ready to start using the Nterilizer at our lab to reduce the potential risk associated with the use of liquid nitrogen during crop reservation processes. Every single change to increase quality and reduce risks is more than welcome in the ivf labs. Thanks Lodovico Parmegiani for teaching us!!!  
CARLA OLMEDO Consorcio Hospital General Universitario de Valencia  
#quality #hospital #change #cryopreservation #ivf

Oltre 1

# Se fossero informate... Quale box preferirebbero le pazienti?



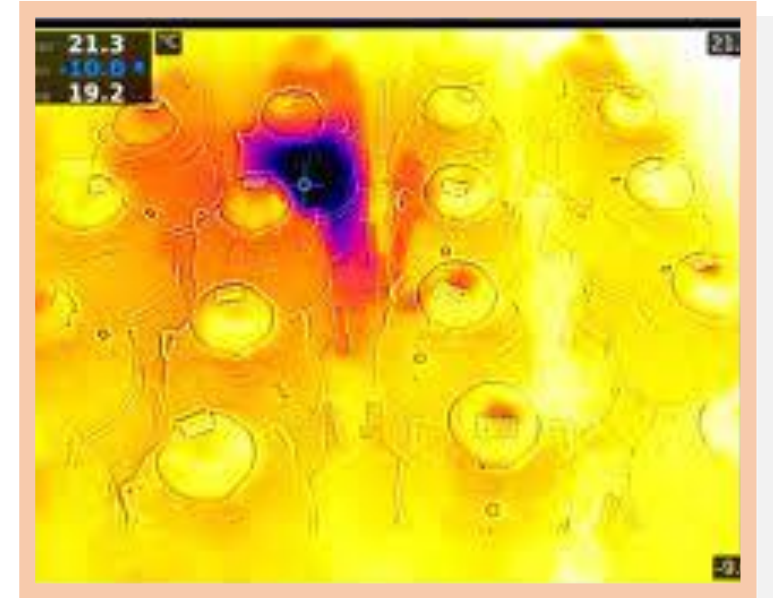


# Scenari futuri del biobanking



# Stoccaggio

# Dai tank in laboratorio alle cryo-rooms



# Nel futuro avremo i cryorobots?

---





# Applicazioni in altri ambiti della vitrificazione



**Next Fertility**  
GynePro



# Cellule staminali da Tessuto Adiposo

Il tessuto adiposo umano è una fonte di cellule staminali ideale per terapie con cellule autologhe.

Il tessuto adiposo viene recuperato in sedi di accumulo corporeo, ed immediatamente reimpiantato nella sede da trattare dello stesso paziente.

Il recupero di tessuto adiposo autologo avviene per liposuzione.

Per ogni reimpianto di tessuto adiposo «fresco» è necessario un intervento di liposuzione.

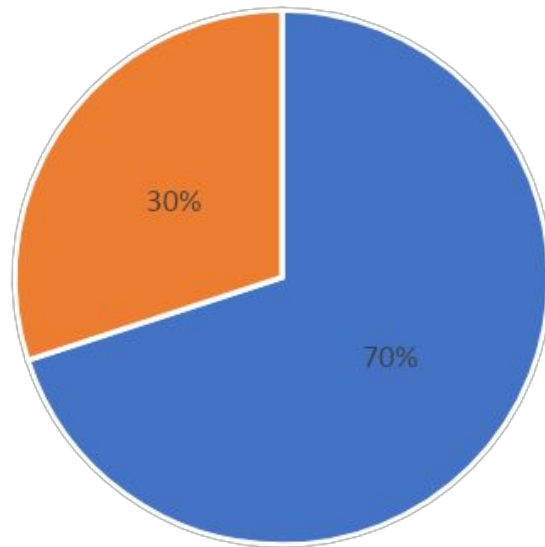
Non è possibile eseguire ripetuti interventi di liposuzione:

- necessità di ambiente chirurgico attrezzato
- necessità di eseguire autotrapianti ravvicinati nel tempo
- rischio chirurgico durante le manovre di prelievo
- esaurimento delle riserve di accumulo corporeo



# Impiego

## REIMPIANTO Cellule Staminali



■ fresco ■ criopreservato

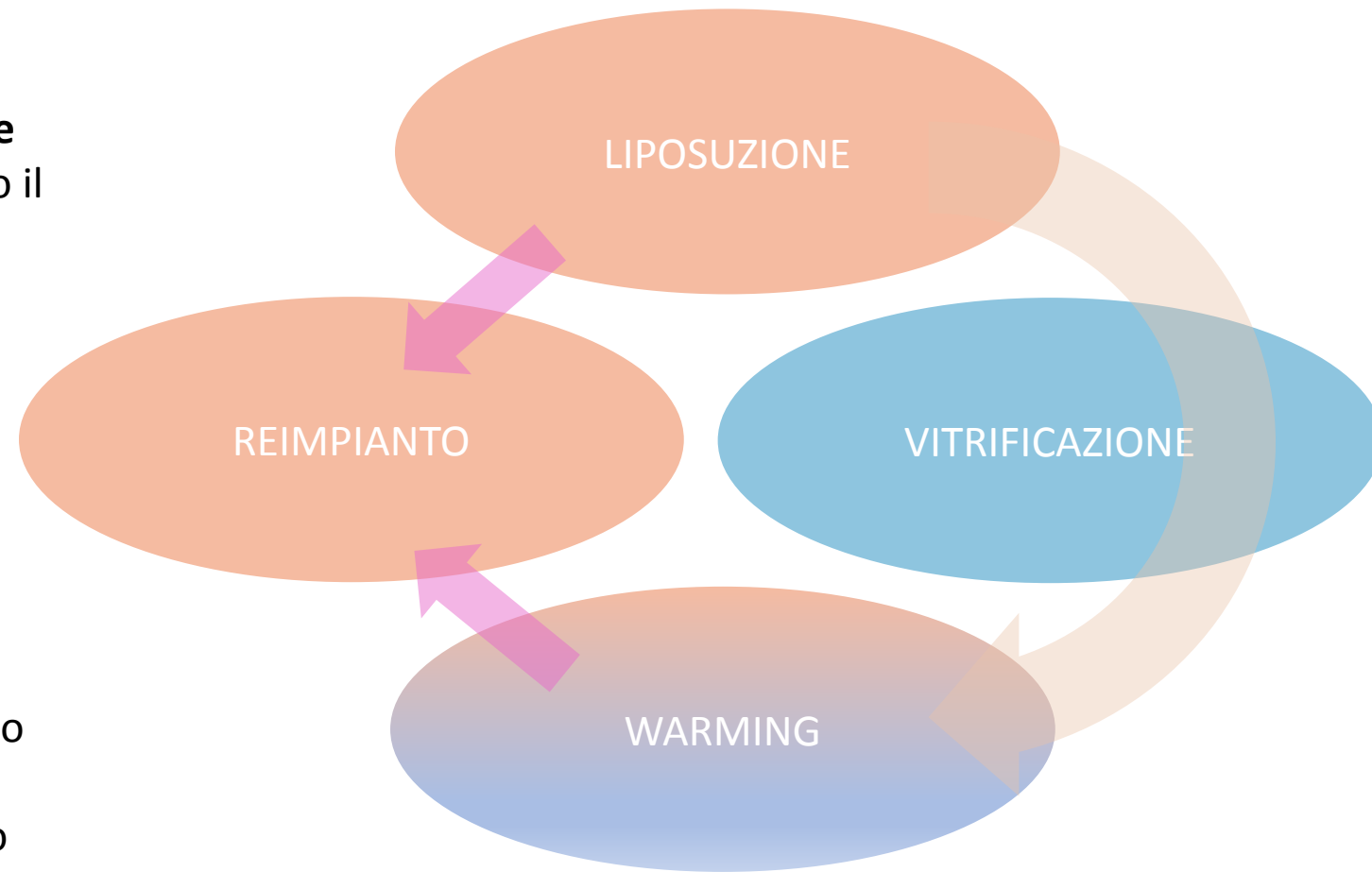
## CELLULE STAMINALI DA TESSUTO ADIPOSO

- Osteoartrosi
- Neurodegenerazione
- Medicina Rigenerativa Estetica
- Wound care, Ginecologia, Proctologia
- Nuove frontiere
  - Malattia di Crohn\*

\* *Laureti et al, Inflamm Bowel Dis 2019*

# Il cambio di paradigma nel Tessuto Adiposo

Nella PMA, un settore nel quale la sopravvivenza di ogni singola cellula è fondamentale, la **vitrificazione per immersione diretta in azoto liquido** è diventato il **gold-standard** essendo la procedura di criopreservazione più efficiente che permette la **sopravvivenza del 99% degli embrioni umani**. Lo stesso approccio usato nella PMA può essere applicato in altri ambiti dove è necessaria un'altissima resa della procedura di congelamento/scongelamento. E' possibile traslare l'esperienza acquisita nella PMA per eseguire la **vitrificazione, lo stoccaggio, la tracciabilità e lo scongelamento aseptico** del tessuto adiposo. Il ruolo degli embriologi e dei centri PMA (Istituti di Tessuti riconosciuti dal CNT) potrebbe essere decisivo nello sviluppo di questa applicazione.

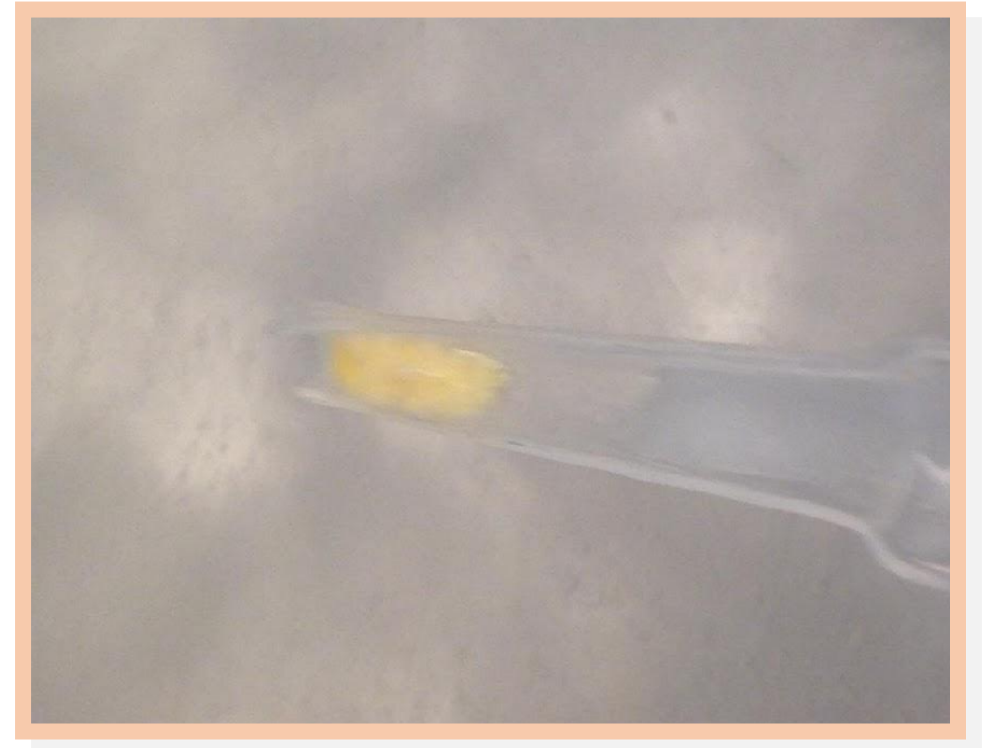


# Vitrificazione del Tessuto Adiposo

La vitrificazione **asettica per immersione diretta in azoto liquido** permette di criopreservare in modo efficiente il Tessuto Adiposo, che potrà essere successivamente reimpiantato.

In questo modo è possibile:

- evitare interventi multipli di liposuzione
- avere a disposizione in qualsiasi momento il tessuto da reimpiantare
- creare una riserva preventiva per future terapie



*Ph. credit: Parmegiani - Unpublished*

# Bancaggio Tessuto Adiposo



Alcune società già offrono un sistema di bancaggio in remoto ispirato alla crioconservazione delle cellule staminali da cordone ombelicale. **Non viene impiegata la vitrificazione.** Il modello di business di queste società si basa sul pagamento di canone (alto) da parte dei pazienti per: ritiro del campione, crioconservazione, bancaggio per 5-6 anni e trasporto nella sede di utilizzo.

- Modello cordone ombelicale – il bancaggio privato è una «**insurance**» per un eventuale futuro utilizzo autologo, che avviene **raramente** (solo lo 0,04% dei campioni congelati viene utilizzato, dopo coltura e crescita cellulare)\*
- Modello PMA – il bancaggio è una «**commodity**» funzionale al reimpianto (**70% dei trattamenti viene eseguito con cellule congelate**)



\* Dessels et al Stem Cells Transl Med 2018

# Conclusioni

---

- **Efficienza**

- Vittrificazione *gold standard* nella PMA da almeno 10 anni
  - ha permesso di raddoppiare i tassi di sopravvivenza. Circa 3 milioni di bambini nel mondo sono nati da embrioni criopreservati \*, **si può stimare che quasi 1 milione di bimbi non sarebbe nato se fossimo rimasti allo slow freezing!**

- **Sicurezza**

- Vittrificazione Personalizzata Virus-Free Blockchain

- **Scenari futuri**

- La vittrificazione per immersione diretta in azoto liquido troverà applicazione in altri ambiti della medicina umana, ove è necessaria un'alta sopravvivenza alla procedura di congelamento/scongelamento