Presidenza del Consiglio dei Ministri

CONFERENZA PERMANENTE PER I RAPPORTI
TRA LO STATO, LE REGIONI E LE PROVINCIE AUTONOME
DI TRENTO E DI BOLZANO

Accordo, ai sensi degli articoli 2, comma 1, lettera b), e 4, comma 1, del decreto legislativo 28 agosto 1997, n.281, tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano sulla proposta del Ministero della salute recante il documento "Tutela della fertilità nei pazienti oncologici per la definizione di un percorso diagnostico assistenziale (PDTA) per pazienti oncologici che desiderino preservare la fertilità".

Rep. Atti n. 27/CSR del 21 febbraio 2019

LA CONFERENZA PERMANENTE PER I RAPPORTI TRA LO STATO, LE REGIONI E LE PROVINCE AUTONOME DI TRENTO E BOLZANO

Nella odierna seduta 21 febbraio 2019:

VISTI gli articoli 2, comma 1, lettera *b*) e 4, comma 1, del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281, che affidano a questa Conferenza il compito di promuovere e sancire accordi tra Governo e Regioni, in attuazione del principio di leale collaborazione al fine di coordinare l'esercizio delle rispettive competenze e svolgere attività di interesse comune;

VISTA la legge 19 febbraio 2004, n.40, recante "Norme in materia di procreazione medicalmente assistita" e, in particolare, l'articolo 17;

VISTA la determina dell'Agenzia italiana del farmaco 4 agosto 2016, recante "Sostituzione del testo della Nota 74 di cui alla Determinazione del 27 aprile 2010", che ha aggiornato la nota 74 in ordine alla possibilità di utilizzo, a carico del Servizio sanitario nazionale, dei farmaci per la preservazione della fertilità nelle donne affette da patologie neoplastiche che debbano sottoporsi a terapie oncologiche in grado di causare sterilità transitoria o permanente, con l'intento ultimo di perseguire un obiettivo di guarigione dal cancro che preveda la preservazione di tutte le funzioni vitali, incluse la fertilità e il desiderio di procreazione;

VISTO il decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri 12 gennaio 2017, recante "Definizione e aggiornamento dei livelli essenziali di assistenza", di cui all'articolo 1, comma 7, del decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 502, che indirizza le azioni del Servizio Sanitario Nazionale verso il rispetto del principio di appropriatezza e la individuazione di percorsi diagnostici terapeutici assistenziali e linee guida, in particolare, l'articolo 24, lettera *i)* e l'allegato 4;

VISTA l'Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131, tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano concernente il "Documento tecnico di indirizzo per ridurre il carico di malattia del cancro - Anni 2011- 2013" (Rep. Atti n. 21/CSR del 10 febbraio 2011);

VISTA l'Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131, tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano concernente il "Documento tecnico di indirizzo per ridurre il *burden* del cancro - Anni 2014-2016" (Rep. Atti n. 144/CSR del 30 ottobre 2014);

VISTA l'Intesa sancita in Conferenza Stato-Regioni nella seduta del 10 luglio 2014 concernente il "Nuovo Patto per la Salute 2014-2016" (Rep. Atti n. 82/CSR);

VISTA l'Intesa sancita in Conferenza Stato-Regioni nella seduta del 13 novembre 2014 sul documento recante "Piano Nazionale per la Prevenzione per gli anni 2014-2018" (Rep. Atti n. 156/CSR);

VISTA la nota del 25 ottobre 2017, con la quale il Ministero della salute ha trasmesso la proposta di documento in epigrafe, diramata dall'Ufficio di Segreteria di questa Conferenza in data 31 ottobre 2017;

VISTA la nota del 1 dicembre 2017, con la quale il Ministero della salute ha trasmesso una versione modificata nei punti 8.1.1 e 8.1.2 lettera *a*) del documento precedentemente trasmesso, partecipato alle regioni con nota del 1 dicembre 2017;

VISTA la nota del 14 maggio 2018, con la quale il Ministero della salute ha trasmesso una nuova versione del documento, partecipato alle Regioni con nota del 18 maggio 2018 con contestuale richiesta di assenso tecnico;

CONSIDERATO che, a seguito dell'insediamento della nuova compagine governativa, in data 1 febbraio 2019, il Ministero della salute ha chiesto di proseguire l'iter istruttorio del provvedimento;

CONSIDERATO altresì che, nel corso della riunione tecnica, il Ministero e le Regioni sono addivenuti ad una posizione condivisa sul documento, trasmesso nella versione definitiva dal Ministero della salute in data 20 febbraio 2019;

ACQUISITO nel corso dell'odierna seduta l'assenso del Governo e dei Presidenti delle Regioni e delle Province autonome;

SANCISCE ACCORDO

tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano nei seguenti termini:

PREMESSO CHE

- i percorsi diagnostici terapeutici assistenziali (PDTA) sono strumenti che permettono di delineare, rispetto ad uno o più patologie o problema clinico, il miglior percorso praticabile all'interno di un'organizzazione e tra organizzazioni per la presa in carico del paziente e della sua famiglia;

- i PDTA rappresentano uno strumento indispensabile di *clinical governance*, in quanto garantiscono equità di accesso alle cure e uniformità di comportamenti tra operatori, agevolando, nel contempo, l'appropriatezza organizzativa;

- la funzione riproduttiva ha caratteristiche peculiari che la differenziano dall'attività di altri apparati dell'organismo umano e si colloca al centro della progettualità stessa della vita umana;

- il Piano nazionale per la fertilità del 2015, predisposto all'esito dei lavori del "Tavolo consultivo in materia di tutela e conoscenza della fertilità e prevenzione delle cause di infertilità", dedica una particolare attenzione alla tutela e alla conservazione della fertilità nel paziente oncologico, auspicando tra l'altro la definizione di un percorso clinico-assistenziale per la preservazione della fertilità di tale paziente;

- un percorso clinico – assistenziale specifico va contestualizzato nell'organizzazione territoriale regionale e adeguatamente monitorato ai fini della valutazione dell'efficacia a medio e lungo periodo;

- il Consiglio superiore di sanità ha espresso parere favorevole, nella seduta del 7 giugno 2017, sul documento "*Tutela della fertilità nei pazienti oncologici*", che riporta in appendice "*Il percorso diagnostico terapeutico assistenziale (PDTA) per pazienti oncologici che desiderino preservare la fertilità*", nel quale si propone una definizione di PDTA per la tutela della fertilità e descrive gli elementi costitutivi di tale percorso, relativi ai pazienti oncologici che desiderino preservare la fertilità, che potranno poi avere una diversa articolazione nei vari contesti locali in cui verranno sviluppati anche in relazione ad esigenze specifiche dei bisogni e dei sistemi;

SI CONVIENE

1. Sul documento "Tutela della fertilità nei pazienti oncologici per la definizione di un percorso diagnostico assistenziale (PDTA) per pazienti oncologici che desiderino preservare la fertilità", allegato A, parte integrante del presente atto, al fine di consentire di addivenire a una scelta consapevole e appropriata rispetto alla specificità della patologia e all'età;

2. Sulla definizione da parte delle singole Regioni, Province autonome dell'anzidetto percorso che avviene nel quadro della rispettiva programmazione assistenziale e nel rispetto della connessa programmazione economico finanziaria, in riferimento alle risorse umane, strumentali e finanziarie previste dalla normativa vigente;

3. Che ai fini di cui al punto 2., le Unità di medicina e chirurgia della fertilità, menzionate nel Piano nazionale della fertilità e nell'allegato A devono intendersi quali articolazioni super specialistiche di preesistenti Unità operative, semplici o complesse, mediche o chirurgiche ovvero funzioni organizzative trasversali al percorso di cura per la tutela della fertilità;

4. Che ai fini di cui al punto 2., i Centri di oncofertilità menzionati nell'allegato A devono intendersi quali servizi integrati nella rete ospedaliera, all'interno delle Unità di Medicina e Chirurgia della Fertilità, e nodi cruciali della rete oncologica dotati di tutte le professionalità, che offrono tutte le alternative terapeutiche per preservare la fertilità e per rispristinare la fertilità dopo remissione della patologia di base. Gli elementi caratterizzanti tali Centri saranno introdotti nella definizione della rete oncologica nazionale;

5. Che il Centro nazionale trapianti, ai sensi dell'articolo 6, comma 1, del citato decreto legislativo n. 191 del 2007, definisce linee guida rivolte alle banche di cui al paragrafo 8 dell'allegato A, allo scopo di uniformare i requisiti organizzativi, strutturali e tecnologici e gli *standard* di attività sul territorio nazionale, nonché a verificare l'applicazione dei criteri e dei parametri previsti nelle anzidette linee guida;

6. Che all'attuazione del presente accordo si provvede nei limiti delle risorse umane, finanziarie e strumentali disponibili a legislazione vigente e comunque senza nuovi o maggiori oneri per la finanza pubblica.

IL SEGRETARIO
CONS. Eugenio Gallozzi

IL PRESIDENTE
Sen. Erika Stefani

ALLEGATO A

TUTELA DELLA FERTILITA'
NEI PAZIENTI ONCOLOGICI

In Appendice

PERCORSO DIAGNOSTICO TERAPEUTICO E ASSISTENZIALE (PDTA) PER PAZIENTI ONCOLOGICI CHE DESIDERINO PRESERVARE LA FERTILITÀ

CONSIGLIO SUPERIORE DI SANITÀ
SESSIONE L E SESSIONE LI
SEZIONI CONGIUNTE II E V

GIUGNO 2017 – MAGGIO 2018

INDICE

1.	Introduzione	pag	3
2.	Effetti dei chemioterapici sulle gonadi	"	5
3.	Effetti della radioterapia sulle gonadi	"	9
4.	Gravidanze in pazienti sottoposte a chemio e radioterapia	"	10
5.	Metodiche di tutela della fertilità	"	12
	5.1 Trasposizione ovarica	"	14
	5.2 Schermatura gonadica durante radioterapia	"	14
	5.3 Chirurgia conservativa nei tumori ginecologici	"	14
	5.4 Crioconservazione degli ovociti	"	16
	5.4.1 Carcinoma mammario	"	20
	5.4.2 Pazienti portatrici di BRCA1 e BRCA2	"	23
	5.4.3 Carcinoma endometriale	"	23
	5.4.4 Carcinoma ovarico	"	23
	5.4.5 Tumore ovarico border – line	"	24
	5.4.6 Tempistica della stimolazione ormonale	"	24
	5.5 crioconservazione di ovociti immaturi o maturati in vitro	"	25
	5.6 crioconservazione del tessuto ovarico	"	25
6.	Confronto fra diverse tecniche di preservazione della fertilità nella donna	"	29
7.	Metodiche di tutela della fertilità nell'uomo	"	30
	7.1 Crioconservazione del seme	"	30
	7.2 Modalità di effettuazione della crioconservazione	"	32
	7.3 Crioconservazione del tessuto testicolare	"	33
	7.4 Soppressione testicolare con analoghi del GnRH	"	34
8.	Istituti autorizzati e metodi di individuazione	"	35
	8.1 Percorso per l'individuazione delle banche autorizzate, compiti	"	35
	8.1.1 Strutture deputate alla conservazione della fertilità	"	35
	8.1.2 Criteri per l'individuazione delle banche	"	35
	8.2 Requisiti di qualità e sicurezza della banca di crioconservazione	"	36
	8.2.1 Organizzazione della banca	"	36
	8.2.2 Sistema di gestione della qualità	"	36
	8.3 Informazioni ai cittadini	"	37
	8.4 Normativa europea e nazionale di riferimento	"	38
9.	Bibliografia	"	40

Appendice

PERCORSO DIAGNOSTICO TERAPEUTICO E ASSISTENZIALE (PDTA) PER PAZIENTI ONCOLOGICI CHE DESIDERINO PRESERVARE LA FERTILITÀ – sinossi, mappe e note

1. INTRODUZIONE

I notevoli avanzamenti nella diagnosi e nella terapia delle patologie neoplastiche hanno portato ad un notevole incremento dei tassi di sopravvivenza (32% per le neoplasie diagnosticate tra il 1996 e il 2003 secondo i dati dell'American Cancer Society). La prevalenza di pazienti sopravvissute al cancro tra le giovani donne di età compresa tra 15 e 45 anni è passata da 1 su 1000 nell'anno 2000 a 1/250 nel 2010. Ogni giorno in Italia vengono diagnosticati almeno 30 nuovi casi di tumore in pazienti di età inferiore ai 40 anni; su un totale di 254.979 nuovi casi registrati nel 2010, i pazienti al di sotto dei 40 anni sono 7.828, con netta prevalenza del sesso femminile (4897 donne vs 2931 uomini). Le forme più comuni di cancro in questo sottogruppo di pazienti sono il carcinoma mammario, i tumori della tiroide, il melanoma, il carcinoma della cervice uterina e il carcinoma del colon-retto. L'aumento della sopravvivenza in queste pazienti, associato allo spostamento in avanti dell'età della prima gravidanza (in Italia la percentuale di gravidanze registrate in donne oltre i 35 anni è passata dal 12% nel 1990 al 16% nel 1996, ed è stimata al 25% nel 2025) rendono mandatorie la valutazione e la prevenzione degli effetti a lungo termine delle terapie antineoplastiche, che comprendono il possibile esaurimento ovarico precoce.

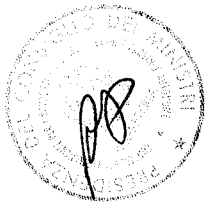
E' importante sottolineare che la fertilità femminile può risultare compromessa anche in presenza di una attività mestruale ciclica. Infatti un qualsiasi declino della riserva ovarica, che non si traduce necessariamente in amenorrea, può determinare minori chances di concepimento e un accorciamento della vita fertile. La crescente complessità dei trattamenti oncologici integrati, più efficaci ma anche più tossici, impone già in fase di programmazione terapeutica una maggior attenzione alla qualità di vita a lungo termine, compresa la riproduzione.

Studi strutturali e ultrastrutturali eseguiti su biopsia ovarica in ragazze sottoposte a chemioterapia hanno dimostrato lesioni piuttosto eterogenee delle gonadi (Marcello,1990; Nicosia 1984). La severità delle lesioni dipende da diversi fattori ma sembra legata principalmente allo stadio funzionale della gonade stessa (prepubere o postpubere) al momento della terapia.

Nelle bambine in età prepuberale la lesione strutturale più frequentemente osservata è rappresentata dalla fibrosi corticale. I follicoli sono danneggiati in maniera variabile: si possono riscontrare quadri in cui c'è una riduzione del numero di follicoli primordiali, fino alla completa assenza di follicoli. Se la biopsia ovarica viene eseguita a distanza di pochi giorni dalla fine del trattamento antineoplastico si possono evidenziare ovociti necrotici e foci emorragici. Studi ultrastrutturali eseguiti su queste giovani pazienti hanno rilevato la presenza di alterazione a livello della componente stromale mentre la componente follicolare presenta una normale morfologia: la cellula uovo è di normale dimensione, così come gli organelli intracitoplasmatici, il rapporto tra ovocita e cellule follicolari è conservato. La situazione si modifica in maniera rilevante quando si considerano ragazze in età puberale o post-puberale: il danno stromale è più diffuso con numerose banderelle di collagene, il numero di follicoli primordiali è ridotto in maniera rilevante sebbene, quando riscontrati, gli ovociti e le cellule follicolari siano risultate normali. La componente vascolare è coinvolta con alterazione delle cellule endoteliali, fibrosi dello stroma pericapillare, irregolarità dei lumi vasali.

Il danno gonadico dopo trattamento antineoplastico è variabile ed è in funzione di:

1. Età della paziente al momento in cui si sottopone alla terapia.
2. Tipo, dose, durata e via di somministrazione della terapia antineoplastica
3. Eventuale associazione di terapia endocrina adiuvante
4. Precedente infertilità



L'età al momento della terapia antineoplastica è un fattore molto importante ai fini delle alterazioni a carico delle ovaia. Alla nascita il patrimonio follicolare è di 952.000 follicoli. Questi follicoli andranno incontro a progressiva riduzione durante gli anni finché, a circa 37,5 ±

1.2 anni, viene raggiunto un livello soglia di 25.000 follicoli in corrispondenza del quale inizia la perimenopausa. Nelle ovaia di donne in menopausa (50 $\pm$ 1 anni) sono riscontrabili all'incirca 1000 follicoli (Gosden,1985 Feddy,1992).

In base a queste osservazioni appare chiaro che terapie aggressive che diminuiscono il patrimonio follicolare possano associarsi più frequentemente all'insorgenza di menopausa precoce in pazienti di età avanzata. Quando la terapia viene eseguita in bambine molto piccole (età inferiore a tre anni) la riduzione del patrimonio follicolare non è molto severa. Il follicolo quiescente, infatti, è più resistente ai danni indotti dagli agenti antineoplastici. Al contrario, quando le pazienti sono in età fertile, i danni vascolari e stromali sono tali da rendere più frequente la perdita della fertilità e il rischio di menopausa precoce (Meirow, 2000).

Uno studio condotto da Horning conferma l'importanza dell'età al momento del trattamento antineoplastico, sulla determinazione del rischio di esaurimento ovarico precoce.

L'amenorrea conseguente ai trattamenti può non essere permanente, ma risolversi nel tempo quando il danno ovarico non è irreversibile. Ciò è stato dimostrato dall'insorgenza di gravidanze in pazienti che presentavano amenorrea e sintomi della menopausa dopo radio e chemioterapia (Horning, 1981). Anche in questo caso gioca un ruolo preponderante l'età della paziente al momento della terapia.

Questi risultati sono stati confermati anche da studi più recenti in cui le pazienti che conservano la funzionalità ovarica dopo terapie antineoplastiche risultano essere significativamente più giovani rispetto a quelle che sono andate incontro a menopausa precoce: 27.4 $\pm$ 8.3 anni Vs 34.7 $\pm$ 8 anni (Nicosia,1985; Marcello 1990).

2. EFFETTI DEI CHEMIOTERAPICI SULLE GONADI

Il razionale dell'utilizzo dei chemioterapici nella cura dei tumori, è la loro capacità di indurre danno nelle cellule in attiva replicazione. Tali farmaci danneggiano però anche le altre cellule dell'organismo dotate di elevato turn-over come le cellule gonadiche. I vari chemioterapici hanno tossicità diversa (Gradishar, 1989; Linee guida AIOM, 2016) (tabella 1)

Tabella 1. Rischio stimato di amenorrea persistente in relazione all'utilizzo dei singoli agenti chemioterapici o di diverse associazioni in pazienti di età diverse (AIOM, 2016).

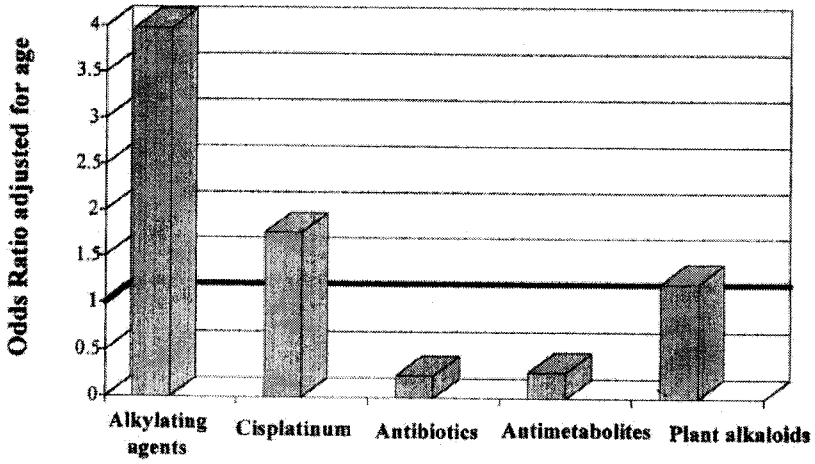
Tabella 1.	
Grado del rischio	Trattamento
Rischio elevato (>80%)	- Trapianto di cellule staminali emopoietiche con ciclofosfamide/irradiazione corporea totale o con ciclofosfamide/busulfano - Radioterapia esterna che includa nel campo d'irradiazione le ovaie - CMF, CAF, CEF, 6 cicli in una donna con età> 40 anni
Rischio intermedio	- CMF, CAF, CEF per 6 cicli in una donna tra 30 e 39 anni - AC per 4 cicli in una donna con età ≥ 40 anni - AC o EC: taxani
Rischio basso (<20%)	- ABVD (doxorubicina/bleomicina/vinblastina/dacarbazina) - CHOP per 4-6 cicli (ciclofosfamide/doxorubicina/vincristina/prednisone) - CVP (ciclofosfamide/vincristina/prednisone) - AML (antraci cline/citara bina) - ALL (polichemioterapia) - CMF, CAF, CEF, 6 cicli di una donna con età < 30 anni - AC 4 cicli in una donna di età < 40 anni
Rischio molto basso o assente	- vincristina - metotrexate - fluorouracile
Rischio sconosciuto	- taxani - oxaliplatino - irinotecan - anticorpi monoclonali (trastuzumab, bevacizumab, cetuximab) - inibitori della tirosino-chinasi (erlotinib, imatinib)

Gli agenti alchilanti accelerano la comparsa della menopausa soprattutto fra le pazienti in età riproduttiva avanzata. Numerosi studi hanno confermato che circa il 50% di donne trattate con mostarda azotata, vincristina, procarbazina e prednisone (MOPP) o con MOPP e radioterapia vanno incontro ad amenorrea (Horning, 1981). In uno studio di Schilsky del 1981 è stato eseguito un follow up di circa 9 anni su 27 pazienti sottoposte a MOPP (associata o meno a radioterapia). Il 46% delle pazienti sviluppò amenorrea permanente e di queste l'89% aveva un'età superiore a 25 anni. L'80% delle pazienti con età inferiore a 25 anni continuò a mestruare regolarmente. Sette (53,7%) delle 13 donne che continuarono a mestruare regolarmente ebbero 12 gravidanze. In due delle 14 pazienti che svilupparono amenorrea negli anni successivi alla terapia si instaurarono tre gravidanze prima che comparisse il fallimento ovarico precoce.

I 13 bambini nati non presentavano anomalie. In uno studio di Viviani (1985) è emerso che l'associazione Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina e Decarbazina (ABVD), nel trattamento del linfoma di Hodgkin, è efficace quanto la MOPP, ma molto meno tossica per l'ovaio.

Meirow (Meirow, 2000) ha messo a confronto il rischio di fallimento ovarico precoce in funzione del tipo di chemioterapico utilizzato, suddividendo i farmaci utilizzati in cinque categorie: Agenti Alchilanti, Cis-Platino, Alcaloidi della vinca, Antibiotici, Antimetaboliti. L'incidenza di esaurimento ovarico precoce è risultata significativamente correlata al tipo di farmaco utilizzato Il tasso complessivo di esaurimento ovarico nelle 168 pazienti trattate è risultato del 34% (odds ratio 1). (Figura 1).

Figura 1. Rischio relativo di esaurimento ovarico precoce in relazione al tipo di chemioterapico utilizzato (Meirow, 2000).



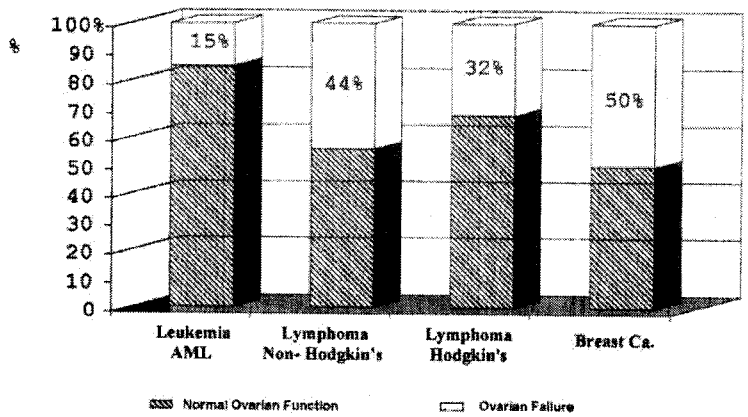
Il rischio più elevato di esaurimento ovarico precoce è associato dall'utilizzo di agenti alchilanti (ciclofosfamide).

Tali farmaci hanno come target le cellule della granulosa. Il loro danneggiamento causa la deplezione follicolare che si osserva nelle ovaia delle pazienti ed è alla base dell'esaurimento ovarico precoce (Ataya,1989).

Un'altra variabile che sembra influenzare il tasso di incidenza di amenorrea dopo chemioterapia è il tipo di neoplasia maligna.

Solamente il 14.9% delle pazienti con Leucemia linfocitica acuta (AML) perde la propria funzione ovarica, mentre il 44.4%, 31.9%, ed il 50% delle pazienti affette rispettivamente da LNH (Linfoma non Hodgking), LH (Linfoma di Hodgking), BC (Breast Cancer) è andata incontro a fallimento ovarico dopo trattamento antineoplastico (figura 2).

Figura 2. Incidenza di fallimento ovarico dopo chemioterapia sulla base della diversa patologia neoplastica di base (Meirow, 2000).



In realtà, queste differenze non sono da attribuire alla specifica neoplasia, ma piuttosto al tipo di protocollo chemioterapico utilizzato. Gli agenti alchilanti, così come pure la terapia sovramassimale (chemio e radioterapia associate a dosi molto elevate) impiegata per il trapianto del midollo osseo (Leiper,1987; Sanders,1983; Meirow, 2000) sono risultati associati ad un'alta incidenza di POF.

Horning (1981) ha condotto uno studio volto a valutare la funzionalità ovarica in pazienti sottoposte a chemioterapia (MOPP) e/o radioterapia. Delle 103 pazienti di età compresa tra i 13 e i 40 anni, 32 (31%) sono andate incontro ad amenorrea. La massima incidenza di amenorrea è

stata riscontrata nel gruppo di pazienti che era stato sottoposto a radio e chemio-terapia associate (52%).

Al contrario, in uno studio di Lacher e Toner (1986) è emerso che il 94% delle pazienti sottoposte a radioterapia e chemioterapia con Tiotepa, Vinblastina, Vincristina, Procarbazina e Prednisone (TVPP) hanno continuato a mestruare durante e dopo la terapia. Il risultato riportato in quest'ultimo studio è stato confermato in un lavoro retrospettivo del Centro di PMA del Policlinico Sant'Orsola Malpighi, condotto in collaborazione con l'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna. 92 pazienti affette da Osteacroma e sottoposte a chemioterapia sono state incluse nello studio. 24 erano state sottoposte a chemioterapia in età prepubere e 68 in età fertile. Il 69% delle pazienti in età postpuberale andò incontro ad amenorrea durante il trattamento, ma solo in 2 pazienti (di 39 e 43 anni) risultò permanente. Dopo la chemioterapia il 28% delle pazienti presentava cicli irregolari (Longhi e Porcu, 2000) (tabella 2) (figura 3, figura 4). Un altro aspetto emerso dallo studio è il ritardo della comparsa di telarca, pubarca e menarca nelle pazienti che sono state sottoposte a terapia antineoplastica prima della pubertà.

Tabella 2. Cicli mestruali pre e post-chemioterapia (Longhi, Porcu, 2000)

Menstrual Activity Before and After Chemotherapy

24 Prepuberal Patients

Median age at chemotherapy: 10.5 years	Mean age at menarche: 13 years (11–16 yrs)
Menstrual activity after chemotherapy (24 patients)	16 regular 8 irregular

68 Postpuberal Patients

Menstrual activity before chemotherapy	Menstrual activity after chemotherapy
53/68 regular	44 regular 7 irregular 2 menopause
15/68 irregular	5 regular 10 irregular

Figura 3. Amenorrea in relazione all'età nelle pazienti postpuberi (Longhi, Porcu, 2000).

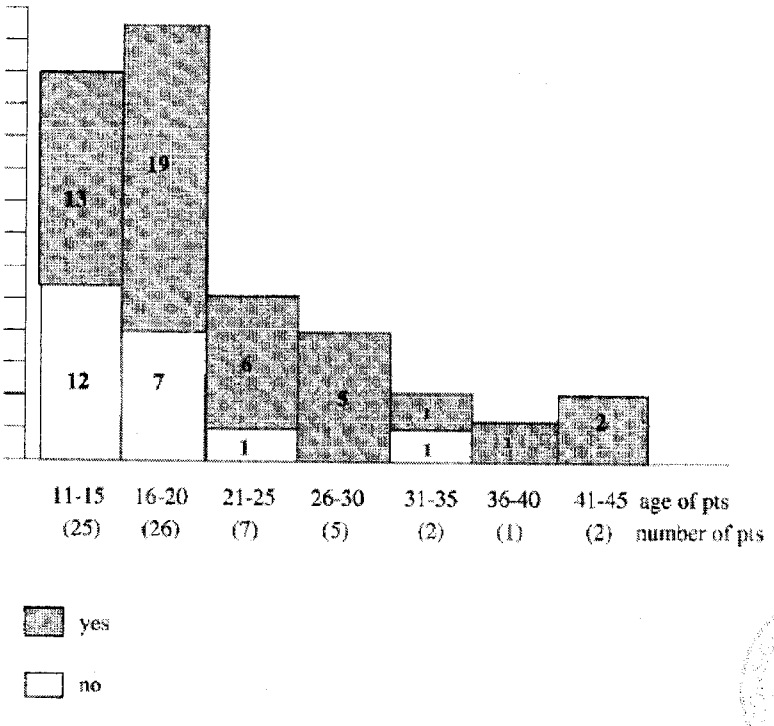
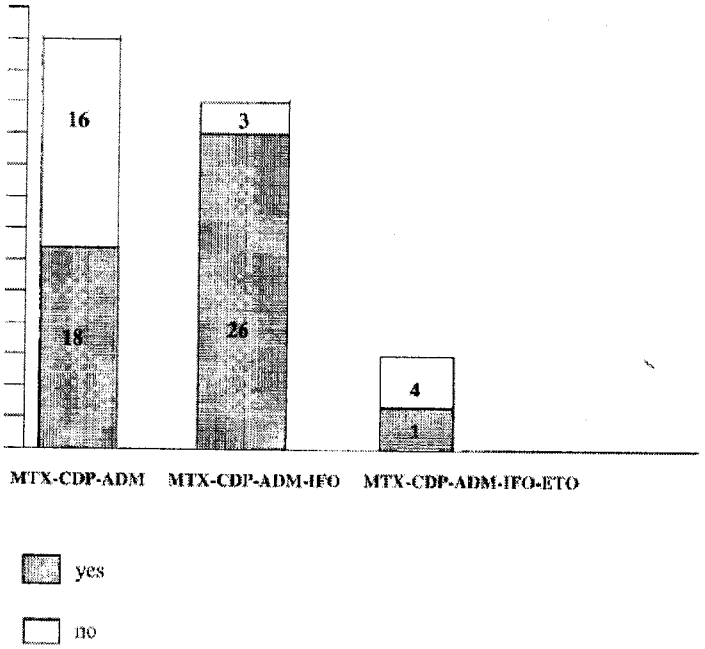


Figura 4. Amenorrea in relazione al tipo di chemioterapia nelle pazienti postpuberi (Longhi, Porcu, 2000).



3. EFFETTI DELLA RADIOTERAPIA SULLE GONADI

Le radiazioni hanno un effetto dannoso sulle gonadi a qualunque età e l'intensità del danno dipende dalla dose, dal tempo di esposizione e dallo stadio di sviluppo delle cellule germinali (Baker,1971; Mandl,1964).

Gli ovociti presentano la loro massima resistenza alle radiazioni quando si trovano bloccati in profase della prima divisione meiotica (Baker, 1971), quindi il danno è correlato all'età e al patrimonio follicolare al momento della terapia (Ash, 1980). A dosi di 150 RAD le pazienti di età inferiore ai 30 anni non subiscono danni apparenti, mentre le pazienti di età superiore ai 40 anni sono già a rischio di menopausa indotta. Tra 250-500 RAD le pazienti di tutte le età presentano disturbi mestruali e il 60% di quelle al di sopra dei 40 anni diventano sterili. Tra i 500-800 RAD il 70% di tutte le pazienti perde la funzionalità ovarica e infine, al di sopra degli 800 RAD tutte le pazienti diventano permanentemente sterili (Ash,1980).

Janson (Janson,1981) ha valutato i livelli di FSH, LH ed estradiolo in pazienti sottoposte a radioterapia per carcinoma della cervice. I prelievi sono effettuati prima della terapia, e dopo 2, 4, 8 settimane dal termine del trattamento. I valori di FSH e LH sono progressivamente aumentati nel tempo, al contrario l'estradiolo è diminuito a conferma di un progressivo esaurimento ovarico (Janson,1981).

Le pazienti che riprendono a mestruare dopo la radioterapia possono comunque andare incontro ad una menopausa precoce, come risultato della deplezione follicolare causata dai chemioterapici e dalla radioterapia. Solo un prolungato follow-up di tali pazienti potrà confermare o smentire questa ipotesi.

In sintesi, diversi fattori influenzano il rischio di infertilità iatrogena: classe, dose e posologia del farmaco impiegato nella chemioterapia, estensione e sede del campo di irradiazione, dose erogata e suo frazionamento in caso di radioterapia, età della paziente. Il maggior rischio di infertilità iatrogena è legato all'utilizzo di agenti alchilanti, mentre un rischio basso è correlato a metotrexate, fluoro uracile, vincristina, vinblastina, bleomicina. I dati relativi al rischio da taxani non sono ancora conclusivi. Per quanto riguarda la radioterapia, una dose compresa tra 5 e 20 Gy sull'ovaio è sufficiente per causare una disfunzione ovarica permanente, indipendentemente dall'età della paziente. Alla dose di 30 Gy la menopausa precoce è certa nel 60% delle donne di età inferiore ai 26 anni. La corretta informazione sui rischi di infertilità iatrogena e sulle strategie disponibili per ridurre l'incidenza di tale effetto (counselling riproduttivo) andrebbe proposto alle giovani pazienti oncologiche subito dopo la diagnosi e la successiva stadiazione della malattia oncologica. Il counselling richiede un approccio multidisciplinare e una comunicazione efficace fra oncologo e medico della riproduzione.



4. GRAVIDANZE IN PAZIENTI SOTTOPOSTE A CHEMIO E RADIOTERAPIA

La gravidanza in pazienti sopravvissute ad una patologia neoplastica solleva due problematiche principali: i possibili effetti dannosi dei pregressi trattamenti antitumorali sulla gravidanza e le conseguenze che la gravidanza potrebbe avere sulla paziente stessa, particolarmente nel caso di neoplasie ormono-sensibili.

I dati relativi all'andamento della gravidanza e agli "outcomes" fetali in pazienti precedentemente sottoposte a chemioterapia o trattamenti endocrini per il carcinoma della mammella, sono complessivamente rassicuranti. La maggior parte dei dati disponibili provengono da donne trattate per tumore della mammella. Non è stato rilevato un incremento del tasso di anomalie genetiche o malformazioni congenite nei nati (Olson, 2005; Leunens, 2008) ma alcuni studi riportano un rischio aumentato di abortività, complicanze del parto, taglio cesareo, parto prematuro (<32 settimane) e basso peso alla nascita (<1500 gr) (Langagergaard, 2006; Dalberg, 2006). E' quindi consigliabile un monitoraggio più attento della gravidanza in donne precedentemente sottoposte a trattamenti antineoplastici, rispetto a quanto si faccia nella popolazione generale.

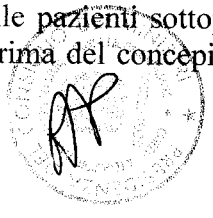
Un recente studio di coorte danese ha esaminato 1037 gravidanze ottenute in 472 pazienti oncologici precedentemente trattati con radioterapia e/o chemioterapia. Non è stata evidenziata alcuna associazione statisticamente significativa tra le malattie genetiche registrate nei nati e i trattamenti antiproliferativi subiti (Winther, 2012).

Per quanto concerne l'effetto della gravidanza sulla patologia tumorale di base, in particolare in caso di tumori ormonosensibili (in età premenopausale circa il 60% dei tumori mammari esprime i recettori ormonali), tutti i dati attualmente disponibili dimostrano che la gravidanza non peggiora la prognosi delle pazienti ma può, al contrario, rappresentare un elemento protettivo.

I dati di una meta analisi condotta su 14 studi e 1.244 donne segnalano una riduzione del 41% del rischio di morte in pazienti che hanno avuto una gravidanza dopo la diagnosi di carcinoma mammario (HR = 0.59, IC 95% 0.50-0.70) (Azim, 2011). Un ulteriore studio multicentrico retrospettivo di coorte ha valutato l'effetto prognostico della gravidanza dopo carcinoma mammario sulla base dello stato recettoriale estrogenico: sia in presenza di positività dei recettori estrogenici che in loro assenza, il rischio di recidiva della patologia neoplastica non è risultato influenzato in maniera positiva dalla gravidanza (Azim, 2013).

Le evidenze scientifiche suggeriscono, quindi, che non esiste una controindicazione reale alla gravidanza nelle pazienti con pregresso carcinoma della mammella. Ciononostante, è necessario eseguire una valutazione approfondita delle condizioni cliniche della paziente, sulla base del rischio individuale di recidiva, prima della ricerca della gravidanza. Inoltre la paziente dovrebbe essere informata esaurientemente riguardo alla possibilità di recidiva della malattia anche a molti anni di distanza dalla prima diagnosi (Cardoso, 2012). L'intervallo di tempo ideale tra il termine dei trattamenti antiblastici e il concepimento non è ancora stato definito in maniera univoca. E' consuetudine diffusa, pur in assenza di evidenze scientifiche comprovanti, suggerire un tempo di attesa di almeno due anni (Litton, 2012): non vi è però un razionale biologico nella scelta di un intervallo di tempo standard. Sembra più ragionevole, nella pratica clinica, tener conto dell'ampia variabilità della casistica e della possibilità di suggerire tempi diversi di attesa, in rapporto alla prognosi della malattia e all'età della paziente. E' necessario considerare e informare la paziente sui potenziali rischi correlati ad una interruzione prematura del trattamento antineoplastico (in particolare, del tamoxifene) che devono essere rapportati e bilanciati con il rischio di infertilità associato all'età e agli effetti iatrogeni del trattamento. Ad oggi, è comunque consigliabile completare la terapia endocrina dopo la gravidanza (Lambertini, 2016).

Una recente revisione della letteratura (Lawrence, 2011) suggerisce, nelle pazienti sottoposte a chemioterapia adiuvante, un periodo "di sicurezza" minimo di 6 mesi prima del concepimento.



Le raccomandazioni della "European Society of Breast Cancer Specialists" concordano sostanzialmente su questo intervallo (Cardoso, 2012). Nonostante non sussistano reali controindicazioni alla gravidanza, la quota di pazienti che ha almeno una gravidanza a termine dopo la diagnosi di carcinoma mammario è tuttora molto bassa: solo l'8% delle donne che ha un'età inferiore a 35 anni alla diagnosi. Questo dato può essere parzialmente spiegato dalla riduzione della fertilità associata ai trattamenti antineoplastici. Le donne lungo sopravviventi dopo chemioterapia o radioterapia presentano, inoltre, risultati peggiori in termini di risposta alla terapia ormonale e di "outcomes" gravidici, quando sottoposte a trattamenti di Procreazione Medicalmente Assistita (Barton, 2012).



5. METODICHE DI TUTELA DELLA FERTILITÀ

Le strategie per prevenire o ridurre il danno a carico delle gonadi nella donna includono (fig. 5):

- Soppressione ovarica con analoghi/antagonisti del GnRh
- Trasposizione ovarica
- Schermatura gonadica durante radioterapia
- Chirurgia conservativa nei tumori ginecologici (cervice, ovaio, utero)
- Crioconservazione dei gameti
- Crioconservazione del tessuto gonadico femminile

Le strategie per prevenire o ridurre il danno a carico delle gonadi nell'uomo includono:

- Crioconservazione del seme
- Crioconservazione del tessuto testicolare
- Soppressione testicolare con analoghi del GnRH

Figura 5. Strategie di preservazione della fertilità nella donna (AIOM, 2016)

TECNICA	DEFINIZIONE	COMMENTI	CONSIDERAZIONI
Criopreservazione degli ovociti (St)	Raccolta e congelamento degli ovociti non fecondati per un successivo utilizzo con tecnica ICSI e successivo impianto.	>2000 nascite in coppie infertili. Negli ultimi anni la metodica si è molto diffusa, soprattutto in Italia e i risultati si sono stabilizzati.	-Richiede 10-14 giorni di stimolazione ovarica; -procedura invasiva per il recupero ovocitario (day surgery).
Criopreservazione dell'embrione (St)	Raccolta degli ovociti, fecondazione in vitro e congelamento degli embrioni per un successivo impianto.	Tecnica usata da più tempo e quindi più consolidata. Richiede la presenza di un partner. Vietata in Italia dalla Legge 40/2004.	-Richiede 10-14 giorni di stimolazione ovarica; -procedura invasiva per il recupero ovocitario (day surgery).
Criopreservazione del tessuto ovarico e reimpianto (Sp)	Congelamento del tessuto ovarico e reimpianto dopo il trattamento antiblastico.	Con questa metodica la letteratura riporta la nascita di 90 bambini.	-Procedura chirurgica; -non eseguibile in presenza di rischio di complicazioni; -non eseguibile quando il rischio di interessamento ovarico è importante.
Schermatura gonadica durante radioterapia (St)	Utilizzo di appropriate schermature per ridurre la dose di radiazioni ricevuta dagli organi riproduttivi.	Serie di casi.	-Possibile solo per selezionati campi di irradiazione; -è necessaria una certa competenza per assicurare che la schermatura non aumenti la dose di radiazioni ricevuta dagli organi riproduttivi.



Trasposizione ovarica (ooforopessi) (St)	Riposizionamento chirurgico delle ovaie lontano dal campo di irradiazione.	Conservazione della funzione endocrina ovarica pari circa al 70%. Sono riportate gravidanze spontanee.	-Procedura chirurgica -la trasposizione dovrebbe essere fatta solo prima della radioterapia per prevenire il ritorno delle ovaie nella loro posizione originaria; -può richiedere il riposizionamento chirurgico e l'utilizzo di tecniche di riproduzione in vitro.
Chirurgia ginecologica conservativa (St e Sp)	Chirurgia che sia il più conservativa possibile.	Ampia serie di casi.	-Procedura chirurgica; -possibile solo negli stadi precoci di malattia; -competenze non disponibili in tutti i centri.
Soppressione ovarica con LHRH analoghi o antagonisti (St e Sp)	Utilizzo di terapie ormonali per proteggere il tessuto ovarico durante chemioterapia.	Studi clinici di fase III disponibili con risultati promettenti, in particolare nelle pazienti con carcinoma mammario.	-La terapia viene effettuata prima e durante la chemioterapia; -metodo semplice e più economico; -potenziale preservazione non solo della fertilità ma dell'intera funzione ovarica.

Le tecniche di crioconservazione che si sono dimostrate efficienti e sicure, rappresentando una opzione concreta per le pazienti, sono la crioconservazione degli embrioni e la crioconservazione degli ovociti maturi. La crioconservazione del tessuto ovarico o dell'intero ovaio e la crioconservazione di ovociti immaturi o maturati in vitro sono considerate ancora tecniche sperimentali.

Sia la crioconservazione degli embrioni che la crioconservazione degli ovociti richiedono un tempo tecnico preliminare necessario per l'induzione della superovulazione, pertanto è necessario informare la paziente tempestivamente su queste possibilità e valutare collegialmente, caso per caso, la tecnica appropriata per ciascuna paziente.

In particolare la crioconservazione degli ovociti non è più considerata una tecnica sperimentale dal Gennaio 2013 (Practice Committeee of ASRM, 2013) e rappresenta, quindi, la tecnica di scelta in pazienti adolescenti, senza un partner e in situazioni legislative, come quella Italiana, in cui la crioconservazione degli embrioni è vietata (Porcu, 2004; Porcu, 2008). La crioconservazione degli ovociti consente, inoltre, di superare le problematiche di ordine etico e logistico legate al congelamento degli embrioni. E' indicata in quelle pazienti che possono dilazionare l'inizio della terapia antineoplastica di almeno 15 giorni e che hanno una riserva ovarica adeguata. Le nascite da ovociti crioconservati in pazienti affette da patologie oncologiche dimostrano la concretezza di questa opzione ma, ad oggi, sono un numero esiguo (8 riportate in letteratura) (Yang, 2007; Porcu, 2008a; Sanchez Serrano, 2010) (tabella 6).

Lo specialista oncologo deve possedere le competenze che gli permettano di stimare il rischio di infertilità per ciascun trattamento e valutare quando tale rischio risulti sufficientemente elevato da dover ricorrere alla conservazione dei gameti prima dell'inizio delle terapie. In quest'ultimo caso, è indispensabile offrire ai pazienti un percorso privilegiato e rapido per la crioconservazione degli spermatozoi o degli ovociti/tessuto ovarico, stabilendo una rete con centri di medicina della riproduzione oppure organizzando un servizio di crioconservazione dei gameti collegato al servizio oncologico stesso. Risulta quindi fondamentale che lo specialista oncologo stabilisca una comunicazione efficace con lo specialista in medicina della riproduzione

per la definizione delle strategie di preservazione della fertilità e per la tempistica delle terapie oncologiche.

Come stabilito dalle linee guida dell'ASCO e dell'ASRM, il counselling riproduttivo ai giovani pazienti oncologici andrebbe proposto subito dopo la diagnosi e la successiva stadiazione della 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 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.

Il counselling riproduttivo va eseguito da un medico che abbia adeguate competenze oncologiche e di medicina della riproduzione. Il counselling richiede comunque 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, maternità o paternità. 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 di preservazione dei gameti o di riduzione della tossicità gonadica a disposizione (AIOM, 2016).

La crioconservazione del seme è oggi una metodica ben consolidata e viene proposta nel 95% dei pazienti in età fertile di sesso maschile; al contrario le tecniche di tutela della fertilità femminile vengono proposte in una percentuale di donne variabile dal 2 al 65% (Lambertini, 2016).

5.1 Trasposizione ovarica

La trasposizione ovarica consiste nello spostare chirurgicamente le ovaie il più lontano possibile dal campo di irradiazione e può essere offerta alle pazienti chè devono essere sottoposte a irradiazione pelvica. 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.

Il tasso di successo di questa tecnica, valutato come preservazione della funzione mestruale, varia dal 33% al 91% nelle varie casistiche. I principali motivi del fallimento di questa tecnica sono rappresentati dalla possibile dispersione di radiazioni al tessuto gonadico e da una possibile alterazione della perfusione ovarica; inoltre, parametri importanti sono rappresentati dalla dose totale di radiazioni somministrate e dalla quota di esse effettivamente ricevute dall'ovaio (Haie-Meder, 1993). Anche l'età della paziente influenza il successo della metodica: non è indicato eseguire la trasposizione ovarica dopo i 38 anni.

5.2 Schermatura gonadica durante radioterapia

Le ovaie vengono spostate chirurgicamente il più lontano possibile dal campo di irradiazione nel caso in cui la paziente sia candidata a radioterapia pelvica.

5.3 Chirurgia conservativa nei tumori ginecologici.

Una terapia conservativa nei tumori ginecologici (cervice, ovaio e endometrio), è proponibile in casi selezionati a buona prognosi solo nelle seguenti circostanze (Tabella 10):

- 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;
- Centri oncologici con esperienza e protocolli di follow-up adeguati.

Tabella 10.Indicazioni alla chirurgia conservativa (AIOM, 2016)

TUMORE	ISTOTIPO	STADIO	ALTRI PARAMETRI	INTERVENTO	DATI DISPONIBILI
CERVICE	Carcinoma squamoso o adenocarcinoma o carcinoma adenosquamoso	IA1	-invasione stromale < 3 mm; -spazi linfovascolari non coinvolti; -margini negativi; -curettage negativo.	Conizzazione	Ampia e dettagliata
		-IA1 con LVSI -IA2-IB1 (<2cm)	-diametro < 2 cm; -invasione stromale < 10 mm; -diametri superficie maggiori con invasione minore e LVSI negativo	Trachelectomia radicale	≥ 900 casi
				Chemioconizzazione	21 casi
				Trachelectomia semplice	15 casi
OVAIO BORDERLINE	Borderline	Tutti gli stadi	-impianti non invasivi completamente resecabili; -parte di ovaio sano.	Tumorectomia o salpingo-ovariectomia monolaterale	Ampie casistiche
OVAIO INVASIVO	Tumori non epiteliali	Tutti gli stadi	Monolaterale	Ovariectomia monolaterale + staging	
	Tumori epiteliali	Ia	G1 (G2)	Salpingoovariectomia monolaterale + staging	783 casi
		Ic	Interessamento ovarico unilaterale e istologia favorevole G1	Salpingoovariectomia monolaterale + staging + trattamento chemioterapico adiuvante a base di platino	
ENDOMETRIO	Tipo 1 ben differenziato	Assenza di invasione miometriale. Assenza di lesioni ovariche. Assenza di coinvolgimento linfovascolare nel campione del curettage.	Recettori positivi per estrogeni e progesterone all'immunoistochimica	Elevati dosaggi di progesterone (+ resezione isteroscopica di lesioni focali)	≥ 400 casi

LVSI: invasione spazi linfovascolari

5.4 Crioconservazione degli ovociti

In tutto il mondo vi è un crescente interesse per la crioconservazione degli ovociti come opzione per preservare la fertilità. L'American Society of Clinical Oncology e la American Society of Reproductive Medicine hanno pubblicato linee guida che raccomandano un adeguato counselling delle pazienti rispetto al potenziale effetto detrimente del trattamento antineoplastico sulla fertilità e alle possibili opzioni di tutela la fertilità (Lee, 2006; Practice Committee of ASRM, 2013).

La crioconservazione degli ovociti rappresenta oggi una opzione reale per la tutela della fertilità, in particolare nelle pazienti oncologiche, come è stato ampiamente documentato da numerosi studi riguardanti la sicurezza e l'efficienza della tecnica (Noyes Porcu Borini, 2009; Wennerholm, 2009; Noyes, 2010; Borini, 2010; Rienzi, 2010; Cobo, 2013; Goldman, 2013; Levi Setti, 2014; Cobo, 2014).

Sulla base di questi dati, le Linee guida ASCO aggiornate (Loren, 2013) rimuovono il carattere di sperimentalità della crioconservazione degli ovociti e raccomandano l'uso estensivo di questa tecnica nelle pazienti oncologiche.

Le problematiche legate alla crioconservazione degli ovociti sono il ritardo di circa 2 -3 settimane dell'inizio della terapia antineoplastica ed il possibile impatto negativo della terapia con gonadotropine nelle pazienti con tumori ormono- sensibili.

Per alcune neoplasie l'inizio dei trattamenti antineoplastici non può essere posticipato di due- tre settimane ed a queste pazienti il congelamento degli ovociti non va proposto.

Negli ultimi anni è stato proposto l'utilizzo di protocolli di stimolazione ormonale d'emergenza ("random-start protocols") che consentono di iniziare la stimolazione in qualsiasi momento del ciclo mestruale. I dati preliminari sono promettenti in termini di ovociti maturi recuperati. L'utilizzo di questi protocolli consente di ridurre al minimo i tempi della stimolazione ormonale e di iniziare in tempi brevi la terapia antineoplastica. (Michaan, 2010; Bedoschi, 2010).

Migliori risultati in termini di recupero ovocitario sono stati dimostrati con l'esecuzione di due cicli consecutivi di stimolazione ovarica; questa possibilità tuttavia richiede tempi maggior non sempre compatibili con le terapie oncologiche (Turan, 2013).

Nei tumori ormono-sensibili la stimolazione ormonale viene eseguita con le gonadotropine e con gli inibitori delle aromatasi (letrozolo) al fine di mantenere i livelli di estrogeni circolanti sovrapponibili a quelli che si riscontrano in un normale ciclo ovulatorio.

La crioconservazione degli ovociti nelle pazienti affette da patologie neoplastiche è stata riportata per la prima volta nel 2004 (Porcu, 2004). In queste 18 giovani pazienti (età media 19 anni), la stimolazione ovarica è risultata molto efficace, con il recupero e la crioconservazione di una media di quindici ovociti per paziente, che consentono potenzialmente l'effettuazione di due trasferimenti di embrioni in media, dopo la guarigione (tabella 3).

Tabella 3. Crioconservazione degli ovociti in pazienti candidate a terapie antineoplastiche (Porcu, 2004).

Pazienti	Patologia	Età	Giorni di stimolazione	Estradiolo	FSH utilizzato	Ovociti crioconservati
1	CML	26	12	450	33	22
2	CML	27	9	1200	30	16
3	Craniopharyngiomas	14	8	750	28	18
4	Medulloblastoma	15	13	630	36	25
5	Myelofibrosis idiopatic	18	12	2820	31	28
6	Essential thrombocytosis	22	11	1150	38	17
7	Hodgkin's disease	17	12	950	36	21
8	CML	24	10	820	29	12
9	Multiple sclerosis	27	10	350	34	17
10	CML	21	9	630	32	12
11	Ewing's sarcoma	16	11	820	33	6
12	Wilms'tumor	19	13	615	39	15
13	CML	14	11	840	37	19

14	**Hodgkin's disease**	15	11	1230	34	11
15	**CML**	24	14	780	42	12
16	**Ewing's sarcoma**	18	13	1200	38	7
17	**Hodgkin's disease**	23	9	1900	28	9
18	**CML**	17	12	480	36	12
	Mean ± S.D.	19 ± 4	11 ± 2	978 ± 558	34 ± 4	15 ± 6

Dati pubblicati successivi su 50 pazienti (età media 31 anni) hanno presentato tassi di successo della crioconservazione degli ovociti comparabili a quelli registrati in donne sane sottoposte a cicli di fecondazione extracorporea (19 ovociti, di cui 15 maturi recuperati in media per paziente) (Noyes, 2010, 2011).

Studi successivi non confermano, però, questo dato, evidenziando una scarsa risposta alla induzione della superovulazione in pazienti affette da patologie neoplastiche rispetto alle pazienti infertili. Una metanalisi di 7 studi (Friedler, 2012) analizza i risultati della stimolazione ormonale in 227 pazienti oncologiche, confrontandoli con 1258 cicli effettuati per sterilità tubarica o maschile. Le caratteristiche delle pazienti e le patologie neoplastiche sono riportate nella tabella sottostante (tabella 4)

Tabella 4. Età delle pazienti, tipo di neoplasia e indicazione alla fecondazione in vitro (Friedler, 2012).

Patients' age and malignancies, and indication for in vitro fertilization in the controls.

Study	No. of patients: Study (N = 218)	No. of patients: Control (N = 1,53)	Age (mean ± SD): Study	Age (mean ± SD): Control	Breast cancer	Lymphoma	Leukemia	Gynecologic cancer: Ovarian	Gynecologic cancer: Uterine	Gynecologic cancer: Cervix	Other malignancies*	Indication for IVF/ICSI in controls: Male factor	Indication for IVF/ICSI in controls: Tubal
Pal et al., 1998 (24)	5	12	31 ± 2	32 ±						3	2		12
Oktay et al., 2006 (28)	47	55	30 ± 3.6	35 ± 3.9	47								56
Knopman et al., 2009 (34)	28	35	34 ± 5.1	32 ± 5	10	4	1	4	4	1	1	135	
Kim et al., 2010 (35)	28	57	31 ± 5.3	31 ± 4.6	11	4	3	1			3	57	y
Quintero et al., 2010 (36)	50	50	32 ± 5	32 ± 5	28	17	1				11	50	
Michaan et al., 2010 (37)	22	22	27 ± 3	34 ± 4.2	12		2				3		22
Robertson et al. 2011 (33)	58	921	34 ± 5	35 ± 4	16	3	5	3	1		11	921	

* Comprises colon, lung, thymoma, multiple myeloma, colon, Ewing sarcoma, brain, osteosarcoma, pseudomyxoma peritonei, and focal proliferative glomerulonephritis.

Friedler. Ovarian response in women with malignancy. Fertil Steri 2012.

Il numero di ovociti recuperati nelle pazienti oncologiche è risultato significativamente piu' basso rispetto al gruppo di controllo (9 vs 10.8, p=0.002). Non sono state riscontrate, al contrario, differenze significative nei tassi di fertilizzazione e nel numero medio di embrioni 2 PN formati. Questi dati riguardano un numero limitato di pazienti e non ci danno informazioni esaustive sull'efficienza clinica della induzione della superovulazione con congelamento. Oktay ha anche riportato un'associazione tra lo stato di portatore di BRCA1 e una scarsa risposta alla terapia (Oktay, 2010).

La casistica più ampia pubblicata sulla crioconservazione degli ovociti per la tutela della fertilità nelle pazienti oncologiche è quella della clinica spagnola di Riproduzione Assistita IVI. Garcia Velasco et al (Garcia Velasco, 2013) hanno pubblicato i dati relativi a 355 cicli di induzione della superovulazione con gonadotropine, finalizzati al congelamento ovocitario in 340 pazienti affette da patologie neoplastiche. Il 67% delle pazienti era affetta da carcinoma mammario, l'11% da linfoma di Hodgkin, il 5% da linfoma non-Hodgkin e il 3.5 % da neoplasie gastrointestinali.

La durata media della stimolazione ormonale in queste pazienti è risultata di 9.5 +/- 5.9 giorni, con il recupero di 11.8 +/- 8 ovociti in media per paziente e il congelamento di 8.5+/- 6.4 ovociti per paziente (tabella 5).

Tabella 5. Caratteristiche demografiche e caratteristiche della stimolazione ormonale nelle pazienti non-oncologiche e oncologiche sottoposte a congelamento degli ovociti (Garcia Velasco, 2013)

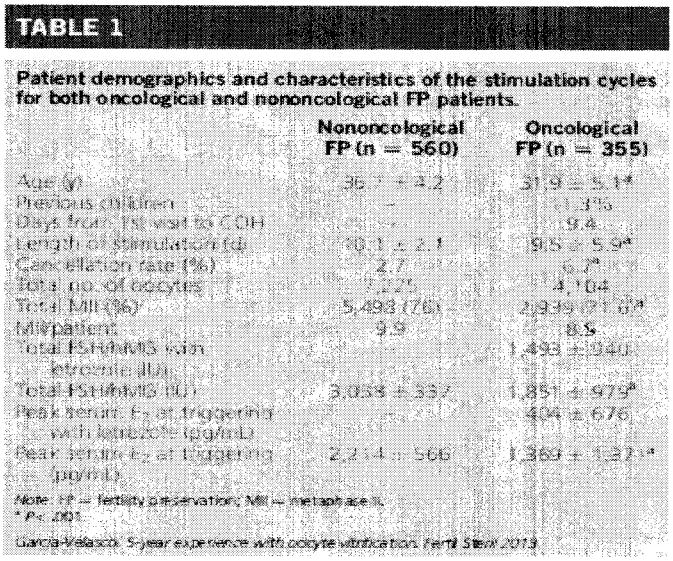


TABLE 1

Patient demographics and characteristics of the stimulation cycles for both oncological and nononcological FP patients.

	Nononcological FP (n = 560)	Oncological FP (n = 355)
Age (y)	36.7 ± 4.2	31.9 ± 5.1[a]
Previous children	–	1.1[b]
Days from 1st visit to COH	–	9.4
Length of stimulation (d)	10.1 ± 2.1	9.5 ± 5.9[a]
Cancellation rate (%)	2.7	6.7
Total no. of oocytes	22.1	4.104
Total MII (%)	5,493 (76)	2,939 (71.6)[a]
MII/patient	9.9	8.5
Total FSH/MMS (IU) letrozole (IU)		1,493 ± 940
Total FSH/MMS (IU)	3,053 ± 537	1,851 ± 975[a]
Peak serum E_2 at triggering with letrozole (pg/mL)		404 ± 676
Peak serum E_2 at triggering (pg/mL)	2,214 ± 566	1,369 ± 1,221[a]

Note: FP = fertility preservation; MII = metaphase II.
[a] $P<.001$.

García-Velasco. 5-year experience with oocyte vitrification. Fertil Steril 2013

Quattro di queste pazienti sono tornate dopo la remissione dalla patologia di base, per lo ottenere la gravidanza tramite lo scongelamento degli ovociti. 2 gravidanze sono state ottenute rispettivamente in una paziente con adenocarcinoma endometriale e in una paziente affetta da linfoma non-Hodgkin. Nel primo caso la gravidanza si è arrestata spontaneamente alla 6^ settimana, mentre nel secondo caso la gravidanza si è conclusa con la nascita di un bambino sano di 3440 gr. Questa ampia casistica conferma i buoni risultati della stimolazione ormonale registrati nelle pazienti oncologiche, che appaiono sovrapponibili a quelli ottenuti in cicli di congelamento per ragioni non-mediche. Gli autori sottolineano, inoltre, la concretezza e l'efficienza della crioconservazione degli ovociti quale metodica per la tutela della fertilità nelle pazienti neoplastiche in età fertile.

Gli outcomes positivi della stimolazione ormonale nelle pazienti oncologiche sono stati confermati in uno studio recente della Harvard Medical School, in cui vengono riportati i dati relativi a 17 anni di tutela della fertilità tramite congelamento di ovociti ed embrioni (Cardozo, 2015). 63 pazienti affette da patologie neoplastiche sono state sottoposte a 65 cicli di induzione della superovulazione, seguiti da congelamento degli embrioni (57 casi) o da congelamento degli ovociti (6 casi). Il 65% delle pazienti era affetta da carcinoma mammario, il 13% da una neoplasia ginecologica, l'8% da neoplasie ematologiche, il 3% da cancro del colon, il 3% da sarcoma e l'8% da altre patologie neoplastiche. I risultati della stimolazione ormonale sono stati confrontati con un gruppo di controllo costituito da pazienti affette da sterilità tubarica e sono risultati comparabili nei due gruppi, in termini di numero di ovociti recuperati e numero di embrioni ottenuti. 21 pazienti oncologiche (37 %) sono tornate dopo la remissione dalla malattia per cercare una gravidanza tramite lo scongelamento degli embrioni. La percentuale di gravidanza e il tasso cumulativo di nati vivi sono risultati anch'essi sovrapponibili tra le pazienti oncologiche e le pazienti sterili (rispettivamente 37% vs 43% , p= 0.49 e 30 vs 32%, p= 0.85).

L'Unità di tutela della Fertilità dell'Istituto San Raffaele ha pubblicato la sua casistica relativa alle pazienti oncologiche sottoposte ad una metodica di tutela della fertilità tra il 2011 e il 2014. 47 su 96 pazienti (49%) con età media di 27 anni, sono risultate eleggibili per la crioconservazione degli ovociti prima dell'inizio della terapia gonadotossica. 17 (17.7%) erano affette da carcinoma mammario, 10 (10.4%) da sarcoma, 15 (15.6%) da neoplasie ematologiche, 3 (3.1 %) da tumori del sistema nervoso centrale. In queste pazienti sono stati recuperati in media 10 ovociti e congelati 7.5 ovociti dopo stimolazione ovarica (Sigismondi, 2015).

Le principali Società Internazionali di Medicina della Riproduzione, Ginecologia ed Oncologia hanno fatto proprie le evidenze scientifiche sul congelamento degli ovociti nelle pazienti oncologiche, elaborando linee guida in merito.

La "Practice Commission of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology" hanno pubblicato linee guida sulla crioconservazione preventiva degli ovociti ai fini della tutela della fertilità, elaborando la seguente raccomandazione conclusiva (Practice Committee of ASRM, 2013):

- "In patients facing infertility due to chemotherapy or other gonadotoxic therapies, oocyte cryopreservation is recommended with appropriate counseling (Level B)".

Questa raccomandazione è stata recentemente sottoscritta dall'American College of Obstetrcians and Gynecologists che sottolinea l'efficienza e la sicurezza della tecnica di crioconservazione degli ovociti e ne promuove l'applicazione estensiva nella pratica clinica da parte dei medici: "Oocyte cryopreservation, with appropriate counselling, is recommended for patients facing infertility due to chemotherapy or other gonadotoxic terapie".

Anche l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) ha espresso parere favorevole rispetto al congelamento degli ovociti, quale metodica di tutela della fertilità, in un articolo pubblicato recentemente dal titolo: "Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update" (Loren, 2013). Le raccomandazioni riguardanti le donne in età fertile e le bambine recitano:

1. "Present both embryo and oocyte cryopreservation as established fertility preservation methods"
2. "Use established methods of fertility preservation (semen cryopreservation and oocyte cyropreservation) for postpubertal minor children, with patient assent, if appropriate, and parent or guardian consent"

Nonostante i dati comprovino la sicurezza ed efficacia della tecnica, la crioconservazione degli ovociti per la tutela della fertilità non viene applicata in maniera estensiva e le nascite da crioconservazione di ovociti in pazienti affette da patologie neoplastiche riportate in letteratura sono solamente 8 (Yang, 2007; Porcu, 2008; Sanchez Serrano, 2010; Kim, 2011; Garcia Velasco, 2013; Porcu, 2014; Da Motta, 2014, Alvarez, 2014) (Tabella 6).



Tabella 6. Nascite da crioconservazione di ovociti in pazienti oncologiche

	Yang, 2007 (first birth in gestational carrier)	Porcu. 2008 (first birth in patient with ovarian cancer)	Sànchez-Serrano, 2010 (breast cancer after transplantation of ovarian tissue)	Porcu, 2011 (first birth in patient with mammalian cancer)	Garcia Velasco, 2013 (one birth in non-Hodgkin lymphoma)	Alves da Motta, (breast cancer)
Patient's age	27	26	38	37	33	36
Pathology	Hodgkin's lumphoma	Ovarian borderline cancer	Medullar breast cancer	Breast cancer	Non-Hodgkin lymphoma	Breast cancer
Oocytes retrieved (n°)	13	7	9	16	4	35
Freezing protocol	Slow freezing	Slow freezing	Vitrification (after transplantation of ovarian tissue)	Slow freezing	Vitrification	Vitrification
Oocytes criopreserved (n°)	12	7	1°cycle:5 2°cycle:4	14	4	28
Oocytes thawed (n°)	1° cycle: 5 2° cycle: 4	3	1°cycle:5 2°cycle:4	4	4	14
Oocytes survived (n°)	1° cycle: 4 2° cycle: 2	3	1°cycle:5 2°cycle:4	4	4	12
Oocytes fertilized (n°)	1° cycle: 4 2° cycle: 2	3	7	4	4	11
Embryos transferred (n°)	1° cycle: 4 2° cycle: 2	3	2	3	2	3
Clinical pregnancy (n°)	1° cycle: no 2° cycle: yes	yes (twin pregnancy)	yes (twin pregnancy)	yes	yes	Yes
Live birth (n°)	1 (healthy male at 37 weeks of gestation)	2 (two healthy females at 38 weeks of gestation)	2 (two healthy boys at 33 weeks of gestation)	1 (healthy male)	1 (healthy male at 39 weeks)	1 (healthy baby at term)
Mode of delivery	Spontaneous delivery	elective caesarean section	elective caesarean section	Caesarian section	Vaginal delivery	Caesarian section
Weight	3062 gr	2100 gr, 2400 gr	1650 gr, 1830 gr	3320	3440 gr	2970 gr

Il congelamento degli ovociti è effettuabile con due diverse metodiche: il congelamento lento e la vitrificazione. Il congelamento lento è stata la prima procedura ideata e consiste nel congelare gradualmente gli ovociti con basse concentrazioni di agenti crioprotettori per ridurre i danni intracellulari. La vitrificazione invece, utilizza alte dosi di crioprotettori e un rapido raffreddamento eliminando i danni dovuti alla formazione di cristalli intracellulari. Diversi studi hanno dimostrato una maggior efficacia in termini di sopravvivenza ovocitaria, tasso di fertilizzazione e pregnancy rate della vitrificazione rispetto al congelamento lento (Glujovski D, 2014; Levi Setti,2014). Inoltre confrontata con il congelamento lento non aumenta i danni al DNA, alterazioni del fuso meiotico e le possibili aneuploidie. (Zhang, 2015)

5.4.1 Carcinoma mammario

Il carcinoma della mammella è il più comune carcinoma invasivo nella donna. In circa il 25% dei casi insorge in pazienti in età premenopausale e in circa il 15% insorge prima dei 45 anni. I più comuni protocolli di chemioterapia adiuvante fanno ricorso ad agenti farmacologici che hanno un impatto negativo sulla fertilità. Una delle modalità più efficaci nel preservare il potenziale riproduttivo di queste pazienti è rappresentata dal preventivo congelamento di ovociti o embrioni, ottenuti in seguito a cicli di stimolazione ovarica; l'individuazione e la quantificazione degli effetti associati all'utilizzo di farmaci per l'induzione della superovulazione, sull'andamento della patologia tumorale di base, riveste, in questo contesto, un ruolo cruciale, poiché il carcinoma della mammella presenta recettori ormonali (estrogeni e/o progesterone) nel 60% circa dei casi.

Uno studio di Azim et al. pubblicato sul Journal of Clinical Oncology nel 2008, valuta l'effetto della stimolazione ovarica controllata (COS), eseguita in vista della crioconservazione degli ovociti o degli embrioni, in pazienti affette da carcinoma mammario, che ancora non si erano sottoposte a cicli di chemioterapia adiuvante. Il protocollo di stimolazione ovarica comprendeva la somministrazione di un inibitore dell'aromatasi (letrozolo) a partire dal secondo giorno del ciclo mestruale, seguita, a due giorni di distanza dalla somministrazione di gonadotropine; un antagonista del GnRH veniva aggiunto alla terapia quando i livelli di estradiolo raggiungevano i 250 pg/ml oppure il diametro medio del follicolo di maggiori dimensioni risultava pari a 14 mm. Delle 215 pazienti in totale, 79 sono state sottoposte alla COS, le restanti 136 non hanno partecipato al programma di preservamento della fertilità, costituendo il gruppo di controllo. Il follow up successivo al protocollo chemioterapico ha avuto una durata media di 23.4 mesi. I risultati hanno messo in evidenza 3 (3,8%) recidive o carcinomi mammari controlaterali (due distanti e uno controlaterale) nel gruppo di studio e 11 (8,1%) nel gruppo do controllo (9 distanti, 1 locoregionale, uno controlaterale. Non è stata evidenziata una differenza significativa tra i tassi di recidiva tra i due gruppi (P= 0,36). Nel gruppo di studio il picco di estradiolo raggiunto variava da 58.4 a 1.166 pg/ml con un valore medio di 405.94 pg/ml. Gli autori sottolineano, comunque, che si rendono necessari ulteriori studi sull'argomento, caratterizzati da più lunghi periodi di follow up.

Questi dati sono stati confermati in uno studio presentato al meeting annuale dell'ASRM nel 2013 (Kort, 2013), in cui il rischio di recidiva è stato valutato a distanza di 5 anni in 21 pazienti affette da carcinoma mammario (età media 34 anni) che sono state sottoposte a induzione della superovulazione ai fini del congelamento di ovociti o embrioni prima della chemioterapia e confrontato con il tasso di recidiva registrato in 46 pazienti (età media 35.4 anni) che non avevano effettuato la stimolazione ormonale. Il tasso di recidiva della patologia e la mortalità a 5 anni non sono risultate influenzate dal trattamento di induzione della superovulazione con gonadotropine e letrozolo\tamoxifene.

Uno studio retrospettivo di coorte di Turan (Turan, 2013) ha valutato la correlazione tra il rischio di recidiva e il numero di cicli di induzione della superovulazione effettuati (1 vs 2) in 78 donne di età inferiore o uguale a 45 anni affette da carcinoma mammario di stadio inferiore o uguale a 3. I tassi di recidiva sono risultati sovrapponibili tra i due gruppi (0 su 17 dopo due cicli di stimolazione ormonale e 2 su 49 dopo un solo ciclo) dopo un periodo medio di follow up di 58.5 ±13.6 mesi, mentre il numero medio di ovociti recuperati e di embrioni formati è risultato maggiore nel gruppo che aveva effettuato due cicli di induzione della superovulazione.

Un altro studio di Azim, pubblicato su "The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism" di marzo 2007, pone a confronto gli effetti dell'utilizzo di anastrozolo o letrozolo sui picchi di estradiolo raggiunti durante cicli di iperstimolazione ovarica, in pazienti affette da cancro della mammella. Questi farmaci agiscono entrambi come inibitori dell'aromatasi, riducendo i livelli di estradiolo sierico. Nei 2 gruppi di studio i due diversi inibitori sono stati somministrati a partire dal secondo giorno del ciclo mestruale; la dose di letrozolo è stata mantenuta costante a 5 mg/d mentre i dosaggi di anastrazolo sono stati progressivamente aumentati da 2 fino a 10 mg/d (dose media: 5.7 mg/d), al fine di raggiungere un sufficiente grado di soppressione dei livelli di estradiolo. Confrontando i risultati in termini di tempo di stimolazione, dose totale di gonadotropine usate, numero di follicoli di diametro maggiore di 17 mm e numero di embrioni crioconservati, non sono state evidenziate differenze significative tra i due gruppi. Invece, per quanto riguarda i livelli sierici di estradiolo, le pazienti trattate con letrozolo hanno registrato valori minori; l'anastrozolo presenta, quindi, un minimo effetto soppressivo sull'aumento dei livelli di estradiolo, anche quando utilizzato in dosaggio 5 volte superiore rispetto al letrozolo.

Gli effetti della somministrazione di inibitori della aromatasi sui livelli sierici di estradiolo, vengono esaminati anche da Oktay che nel 2006 pubblica su "The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism" uno studio inerente gli effetti della combinazione di letrozolo e

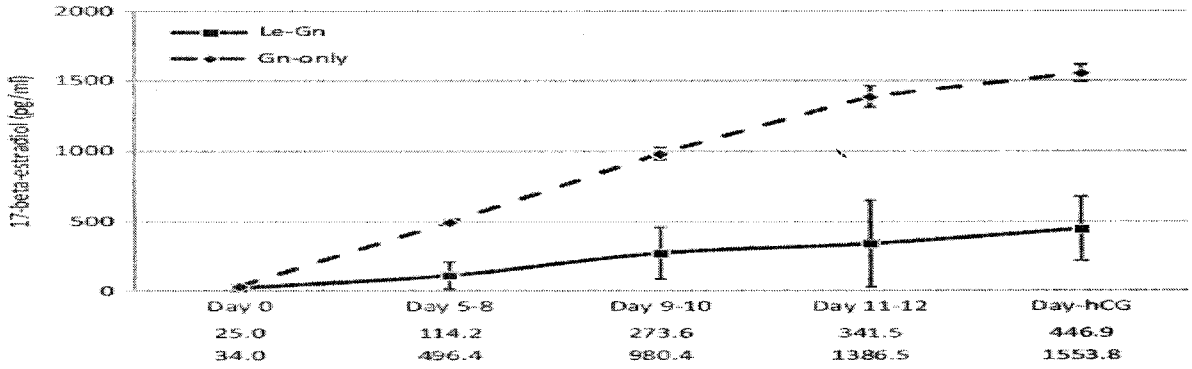
gonadotropine nei trattamenti di fecondazione assistita in pazienti con carcinoma mammario. Le pazienti con carcinoma mammario in stadio I-III sono state sottoposte ad una terapia con 5 mg/die di letrozolo e 150-300 UI/die di FSH. Anche se il picco di estradiolo sierico raggiunto nel gruppo di studio è risultato minore rispetto ai livelli standard, ottenuti in donne sottoposte a cicli di induzione della superovulazione per fattore tubarico, (483,4 ± 278,9 pg/ ml vs. 1464,6 ± 644,9 pg/ ml; P < 0,001), la lunghezza della stimolazione, il numero di embrioni ottenuti e il tasso di fecondazione è risultato simile nei due gruppi di studio; l'utilizzo degli inibitori dell'aromatasi, quindi, pur determinando una riduzione nei livelli di estradiolo e, di conseguenza, una riduzione del rischio potenziale di progressione della patologia tumorale, non sembra essere correlato ad un peggioramento degli *outcomes* delle tecniche di fecondazione in vitro.

Lo studio di Revelli e Porcu confronta un gruppo di pazienti affette da carcinoma mammario con recettori per estrogeni positivi sottoposte ad induzione di superovulazione con inibitori della aromatasi ed un secondo gruppo di pazienti affette da carcinoma mammario negativo per recettori per estrogeni sottoposte ad induzione di superovulazione con sole gonadotropine. Il numero di ovociti recuperati è risultato significativamente più alto nel gruppo trattato con sole gonadotropine mentre i livelli plasmatici di estradiolo sono risultati significativamente inferiori nel gruppo trattato con gonadotropine associate ad inibitori della aromatasi. In accordo con questi risultati è considerato vantaggioso utilizzare il letrozolo in associazione alle gonadotropine in pazienti affette da neoplasie estrogeno dipendenti (Tabella 7, Figura 7, Revelli 2013).

Tabella 7: risultati della stimolazione ormonale tra i due gruppi (Revelli, Porcu, 2013).

	Le-Gn group ($N = 50$)	Gn-only group ($N = 25$)	p
Canceled cycles (n (%)	1 (2%)	3 (12%)	ns
Gn starting dose (IU/day)	180 (168–193)	218 (185–252)	0.045
Total amount of Gn (IU)	1725 (1462–1988)	2322 (1877–2767)	0.021
Length of stimulation (days)	10.6 (9.84–11.36)	10.4 (9.32–11.48)	ns
Peak estradiol level (pg/ml)	446 (320–572)	1553 (1108–1998)	0.001
Follicles <10 mm at hCG	2.49 (1.65–3.33)	1.86 (0.52–3.20)	0.421
Follicles 11–13 mm at hCG	2.60 (1.92–3.28)	2.95 (1.56–4.34)	0.622
Follicles 14–15 mm at hCG	2.76 (2.09–3.43)	2.67 (1.40–4.94)	0.896
Follicles >16 at hCG	5.60 (4.45–6.75)	6.27 (2.77–9.77)	0.530
Retrieved oocytes at OPU	7.60 (6.26–8.94)	10.50 (7.37–13.63)	0.05
Mature (MII) oocytes	6.6 (3.99–17.19)	8 (5.75–10.25)	0.038
E2/retrieved oocyte (pg/ml)	76 (51.8–119.0)	228 (118–238)	0.015
E2/cryopreserved oocyte (pg/ml)	92 (67.2–116.8)	237 (125–349)	0.026

Figura 7: confronto tra i valori di estradiolo plasmatico nei due gruppi (Revelli, Porcu, 2013).



Gli effetti del letrozolo sono stati anche messi confronto con quelli del tamoxifene (Oktay, 2005). (in pazienti con carcinoma mammario che si erano sottoposte a cicli di induzione della

superovulazione. I protocolli prevedevano l'utilizzo di 60 mg/die di tamoxifene da solo (Tam-IVF), o in associazione con piccole dosi di FSH (Tam FSH-IVF), o 5 mg/die di letrozolo in associazione con FSH (letrozolo-IVF). Il tasso di recidive in questi 3 gruppi di pazienti è stato poi confrontato con quello del gruppo di controllo composto da pazienti affette da carcinoma mammario, non sottoposte a induzione dell'ovulazione. Rispetto al gruppo Tam-IVF, negli altri 2 è stato registrato un maggior numero di follicoli, ovociti maturi ed embrioni. Il picco di estradiolo sierico è risultato minore nei gruppi letrozolo- IVF e Tam- IVF rispetto al gruppo Tam FSH-IVF. Dopo un periodo di follow up di 554 ± 31 giorni, il tasso di recidiva di cancro è risultato simile tra le pazienti sottoposte a induzione dell' ovulazione e il gruppo controllo. Gli autori concludono che la somministrazione di basse dosi di FSH in associazione al tamoxifene o al letrozolo è associata a migliori *outcomes* riproduttivi rispetto alla sola somministrazione di tamoxifene e non induce un incremento delle recidive; viene confermato, inoltre, che il protocollo con letrozolo risulta migliore in termini di sicurezza perché determina picchi più bassi di estradiolo sierico.

5.4.2 Pazienti portatrici di BRCA1 e BRCA2

Diversi studiosi si sono interessati alla valutazione degli effetti della terapia di induzione della superovulazione in pazienti che presentavano un rischio geneticamente aumentato di sviluppo del carcinoma della mammella e dell'ovaio. Lo studio di Kotsopoulos pubblicato nel 2008 valuta l' effetto dei trattamenti di fecondazione assistita su un gruppo di pazienti portatrici di mutazioni dei geni BRCA1 e BRCA2. Lo studio ha dimostrato che il trattamento non è associato con un incremento statisticamente significativo nel rischio di carcinoma mammario. Un possibile effetto favorente pare essere rappresentato da protocolli con gonadotropine in rapporto a protocolli che prevedono l'utilizzo di clomifene citrato, sebbene questa associazione non raggiunga la significatività statistica. Non è stata riscontrata nessuna associazione tra lo stato di infertilità e il rischio di cancro mammario.

5.4.3 Carcinoma endometriale

Gli effetti del letrozolo sono stati valutati anche in pazienti affette da carcinoma dell'endometrio. Azim e al. (2007), hanno analizzato la risposta alla somministrazione di letrozolo in 4 pazienti affette da carcinoma dell'endometrio. La terapia con letrozolo è stata iniziata 2 giorni prima della somministrazione di gonadotropine e poi prolungata per tutta la durata del trattamento. Il picco di estradiolo ematico durante la stimolazione è risultato essere di 386,67 ± 102,93 pg/ml; sono stati recuperati una media di 7 ± 2,85 ovociti, per un totale di 4,8 ± 1,76 embrioni per ciclo. Due embrioni ottenuti dagli ovociti di una paziente sono stati trasferiti ad una madre "surrogata" e si è ottenuta una gravidanza trigemina, che ha avuto esito nella nascita di 3 bambini sani. Nelle altre tre pazienti gli embrioni sono stati crioconservati per il futuro. Gli autori hanno quindi concluso che l'uso di letrozolo associato alle gonadotropine nelle pazienti con carcinoma dell'endometrio produce effetti simili ai cicli standard in quanto a risultati, permettendo quindi a queste giovani donne di preservare la loro fertilità per il futuro.

5.4.4 Carcinoma ovarico

Il carcinoma ovarico si inserisce nel novero dei carcinomi estrogeno-dipendenti, cioè di quelle forme tumorali che, potenzialmente, sono influenzate nel loro decorso dalla somministrazione di terapie per l'induzione dell'ovulazione. Abu- Musa, in un case-report del 2008 riporta l'esito di un trattamento di fecondazione in vitro in una paziente di 30 anni con adenocarcinoma ovarico di stadio IC, precedentemente trattato con chirurgia conservativa e chemioterapia. Il trattamento di induzione dell'ovulazione e fecondazione in vitro è stato eseguito 3 anni dopo e ha portato ad una gravidanza singola. I lavaggi intraperitoneali e le biopsie eseguite durante il taglio cesareo

sono risultate negative per un'eventuale recidiva. I controlli eseguiti dopo sette anni sono risultati ancora negativi.

5.4.5 Tumore ovarico border-line

Il ruolo degli estrogeni nei tumori dell'ovaio a comportamento maligno incerto, definiti "border-line" non è stato completamente chiarito. La presenza di recettori per gli estrogeni viene riportata in una elevata percentuale di casi ed è strettamente dipendente dal tipo istologico della neoplasia. In uno studio di Abu Jawdeh (Abu Jadweh, 1996) recettori per gli estrogeni sono stati rinvenuti nel 94% dei tumori border line sierosi (SBTs) , nel 100% dei tumori borderline mucinosi (MMBTs) e nello 0% dei MIBTs. Gli impianti peritoneali degli SBTs sono risultati tutti (4/4) positivi per i recettori degli estrogeni. La gestione conservativa di questa patologia con annessiectomia monolaterale o cistectomia, viene adottata nelle pazienti giovani desiderose di prole e non sembra inficiare il tasso complessivo di sopravvivenza, pur essendo associata ad un maggior tasso di recidive (Morice, 2001).

L'induzione della superovulazione ai fini del congelamento ovocita rio in queste pazienti può essere effettuata prima della chirurgia o dopo una chirurgia conservativa. Gallot nel 2010 ha riportato il caso dell'induzione della superovulazione con congelamento di embrioni in una paziente ventunenne affetta da recidiva di carcinoma ovarico sieroso borderline, stadio IIIA. Lo scongelamento di 2 embrioni dopo 15 mesi ha portato alla nascita di un bambino sano.

5.4.6 Tempistica della stimolazione ormonale

La tempistica della stimolazione ormonale in pazienti affette da patologie neoplastiche riveste un ruolo cruciale. Il trattamento di induzione della superovulazione ha una durata variabile tra 2 e 3 settimane e spesso il tempo a disposizione tra la diagnosi e l'inizio della terapia antineoplastica è molto ristretto. I protocolli standard di induzione della superovulazione prevedono una fase preparatoria con analogo del GnRH oppure la somministrazione delle gonadotropine a partire dal 2^-3^ giorno del ciclo mestruale. Il tempo per l'induzione della superovulazione può non essere sufficiente se la paziente non si trova nella fase adeguata del ciclo mestruale. Dati recenti indicano che l'inizio "random" della stimolazione ormonale, vale a dire in una qualsiasi fase del ciclo, può essere efficiente quanto i protocolli standard di stimolazione (Linee Guida ASCO, 2013). Diverse modalità di stimolazione ormonale in queste pazienti sono state ipotizzate sulla base della fase mestruale e delle necessità oncologiche.

In conclusione, le linee guida della Practice Committee dell'ASRM, dell'ASCO e dell'American College of Obstetricians raccomandano l'applicazione estensiva della crioconservazione degli ovociti quale metodica di tutela della fertilità nelle pazienti neoplastiche.

Nelle casistiche pubblicate non vengono segnalati incrementi di recidiva della patologia di base o della mortalità nelle pazienti oncologiche sottoposte ad induzione della superovulazione. Nonostante ciò, l'utilizzo del Letrozolo in associazione alle gonadotropine nelle neoplasie ormono sensibili viene attualmente supportato dalle Linee Guida Internazionali, a scopo precauzionale.

Le raccomandazioni pratiche dell'ISFP (International Society for Fertility Preservation) per la tutela della fertilità nelle pazienti con carcinoma mammario suggeriscono l'utilizzo di tamoxifene o letrozolo in associazione alle gonadotropine perché questo approccio "è, verosimilmente, piu' sicuro nelle donne con tumori postivi per i recettori degli estrogeni" (ISFP Practice committee, 2012). Anche le Linee Guida ASCO (American Society of Clinical Oncology) (Lee, 2006; Loren, 2013) raccomandano l'uso degli inibitori dell'aromatasi in donne con neoplasie ormono-sensibili.

Allo stato attuale dell'arte, l'aggiunta degli inibitori dell'aromatasi appare, quindi, prudenziale, fino a quando non saranno disponibili ulteriori evidenze.

L'utilizzo di protocolli di induzione della superovulazione non convenzionali che consentano l'inizio immediato della stimolazione potrebbe garantire l'accesso alle tecniche di tutela della fertilità ad un numero maggiore di pazienti.

5.5 Crioconservazione di ovociti immaturi o maturati in vitro

Fra le varie strategie, va annoverata la crioconservazione di ovociti immaturi o maturati in vitro.

Questa metodica prevede di effettuare un prelievo di ovociti senza stimolazione o con una minima stimolazione di 3-5 giorni. Gli ovociti immaturi possono essere maturati in vitro e crioconservati o crioconservati allo stadio di vescicola germinale (GV) o non maturi (MI) e poi maturati in vitro allo scongelamento prima della inseminazione. Il prelievo di ovociti immaturi riduce il tempo necessario per la preservazione e non comporta la fase di iperestrogenismo indotta dalla stimolazione.

Al momento i risultati della crioconservazione di ovociti maturati in vitro e ancor di più quelli della crioconservazione di ovociti immaturi, sono inferiori a quelli ottenuti con gli ovociti maturati in vivo. La casistica è molto ridotta (Cao, 2009). Solo pochi Centri hanno sviluppato la metodica della maturazione in vitro di ovociti nella pratica clinica della Riproduzione Assistita (Coticchio, 2012; Fadini, 2012).

5.6 Crioconservazione del tessuto ovarico

E' una tecnica ancora sperimentale, che ha il vantaggio di non richiedere né un partner né una stimolazione ormonale, e che offre prospettive per preservare sia la funzione riproduttiva sia l'attività steroidogenica. Inoltre è l'unica possibilità per preservare la fertilità in età pre-pubere.

Può essere effettuata in qualsiasi momento del ciclo mestruale, e permette quindi di evitare di ritardare l'inizio del trattamento chemioterapico, ma necessita di un intervento chirurgico laparoscopico per il prelievo di frammenti di corticale ovarica.

A livello internazionale criteri riconosciuti per accedere a questa tecnica sono: età inferiore a 35 anni, una prevista sopravvivenza alla neoplasia superiore a 5 anni, un rischio di esaurimento ovarico precoce maggiore del 50% e per le pazienti di età superiore ai 15 anni l'assenza di pregresse terapie antineoplastiche (Criteri di Edimburgo 2000; Wallace, 2016). Vi sono alcuni autori che eseguono il congelamento di tessuto ovarico nelle pazienti di età inferiore a 37 anni (Callejo, 2001).

Uno studio recente di Paradisi propone come criteri di selezione per il congelamento del tessuto ovarico l'ormone antimulleriano (AMH) e la conta dei follicoli antrali. In particolare il riscontro di valori di AMH tra 0.31 ng/mL e 0.4 ng/mL e una conta follicolare inferiore o uguale a 5 diventa un criterio d'esclusione indipendentemente dall'età valori di AMH superiori a 1.2 ng/mL-1.6 ng/mL e una conta follicolare superiore a 10 potrebbero essere un criterio di inclusione anche in età superiore ai 35 anni (Paradisi, 2016).

Il successo della criopreservazione del tessuto ovarico in donne con età superiore è in realtà incerto per il ridotto numero di follicoli primordiali residui. Controindicazioni assolute sono patologie ad elevato rischio di metastasi ovariche (leucemie, tumori ovarici, tumori solidi metastatici al peritoneo) ed elevato rischio chirurgico.

La rimozione del tessuto ovarico per la crioconservazione necessita di un intervento chirurgico laparoscopico in anestesia generale che richiede circa un'ora di tempo. I follicoli primordiali possono essere congelati in maniera efficace, ma a causa dell'iniziale ischemia a cui vanno

incontro durante il prelievo, un quarto o più di questi follicoli può andare perduto, pertanto la quantità di tessuto ovarico da asportare deve essere ampia.

Esistono due metodiche di congelamento del tessuto ovarico, congelamento lento o vitrificazione; nello studio di Donnez (2015) in 58 delle 60 nascite ottenute dopo questa tecnica, era stato utilizzato il congelamento lento.

Il reimpianto può essere effettuato ortotopicamente (nella sede ovarica dove è stato effettuato il prelievo) o eterotopicamente lontano dalle ovaie in siti particolarmente vascolarizzati (per esempio sotto la pelle dell'avambraccio). Per il reimpianto ortotopico, effettuato per la prima volta 15 anni (Oktay, 2000), sono necessarie due laparoscopie a distanza di pochi giorni una dall'altra, la prima per creare il sito d'impianto e stimolare la neoangiogenesi, la seconda per suturare al sito di impianto i frammenti di tessuto scongelati.

La ripresa della funzionalità endocrina ovarica si ottiene dopo entrambi i tipi di reimpianto nel 90-100% dei casi ma la sua durata è ancora limitata (media 5 anni). (Donnez, 2015). Un ulteriore studio pubblicato nel 2016 riporta una ripresa della funzionalità ovarica nel 93% dei casi con una ripresa di cicli mestruali regolari; nel 50% delle pazienti i valori di FSH riscontrati erano inferiori a 16 mIU/ml. Nelle pazienti sottoposte a crioconservazione di tessuto ovarico dopo chemioterapia l'89% ha mostrato una ripresa di cicli mestruali regolari dopo il reimpianto. Secondo l'autore la crioconservazione del tessuto ovarico andrebbe proposta anche alle pazienti che hanno già fatto cicli di chemioterapia preferibilmente con una età inferiore a 35 anni. (Meirow, 2016).

Tre importanti Centri Europei hanno recentemente pubblicato i risultati dei primi 60 trapianti ortotopici di tessuto ovarico dopo crioconservazione con metodo slow-cooling (Donnez, 2013). La ripresa della funzionalità endocrina è stata osservata nel 93% delle 56 pazienti con follow-up > 3 mesi ed è avvenuta da 3,5 a 6,5 mesi dopo il reimpianto 219. In 3 delle 4 pazienti che non hanno ripreso a mestruare, il congelamento di tessuto era avvenuto in un Centro con minore esperienza (Donnez, 2013). Undici pazienti hanno concepito (due sono alla 24° e 30° settimana di gravidanza al momento della pubblicazione) e sei hanno partorito 12 bambini sani.

Ad oggi le nascite pubblicate dopo reimpianto di tessuto ovarico in pazienti neoplastiche sono 37 (Donnez, 2015), di cui una in Italia (Revelli, 2013). (tabella 8). Le gravidanze sono state ottenute prevalentemente dopo reimpianto sull'ovaio residuo o in una tasca peritoneale; tuttavia, recentemente sono state riportate alcune gravidanze anche da ovociti aspirati da tessuto ovarico reimpiantato in sede eterotopica (Stern 2011, 2013). Lo studio di Donnez e Dolmans del 2015 riporta altre 20 nascite dopo reimpianto di tessuto ovarico per patologie a rischio di insufficienza ovarica precoce non neoplastiche come talassemia e sindrome di Turner (Donnez, 2015).

Tabella 8: nascite dopo reimpianto di tessuto ovarico in pazienti neoplastici (Donnez, 2015).

	Cryopreservation procedure	Live birth		
		Spontaneous	IVF	N°
Donnez *et al.*, Dolmans *et al.*	SF	++++	++	6
Meirow *et al.*	SF	+	+++	4
Demeestere *et al.*	SF	++	–	2
Andersen *et al.*	SF	++++	++	6
Silber *et al.*	SF	++	–	2
Piver *et al.*, Roux *et al.*	SF	++	–	2
Sanchez *et al.*, Pellicer *et al.*	SF	++	+++ (twins)	4
Revel *et al.*	SF		++	2
Dittrich *et al.*	SF	+++	+	4
Revelli *et al.*	SF	+		1
Callejo *et al.*	SF		+	1
Stern *et al.*	SF		++	2
Kawamura *et al.*	VF		+	1

SF, slow freezing; VF, vitrification. The complete list of authors can be found in the reference list [2**,4,42**–44**].

Una preoccupazione circa il reimpianto di tessuto ovarico nelle pazienti oncologiche è rappresentata dalla potenziale reintroduzione di cellule cancerose. Un recente ampio studio

riporta una incidenza del 1,3% (5/391) di riscontri positivi per cellule maligne in campioni istologici di tessuto ovarico analizzati prima della crioconservazione (Dolmans, 2013). In questo studio tutti i campioni positivi appartenevano a pazienti con tumori ematologici. Né in questo né in altri studi sono stati riscontrati campioni positivi all'immunoistochimica in pazienti con carcinoma mammario.

Le patologie a più alto rischio di reintroduzione di cellule cancerose sono la leucemia, il neuroblastoma e il linfoma di Burkitt (tabella 9).

E' indispensabile prevedere un adeguato screening preoperatorio per escludere un possibile coinvolgimento ovarico e un'attenta analisi istologica con tutte le metodiche disponibili sui frammenti prima del reimpianto.

Tabella 9. Rischio di metastasi ovariche in accordo con la neoplasia di base (Donnez, 2015.)

High risk (>11%)	Moderate risk (0.2–11%)	Low risk (<0.2%)
Leukemia	Breast cancer	Breast cancer
	Stage IV	Stages I–II
	Infiltrating lobular subtype	Infiltrating ductal subtype
Neuroblastoma	Colon cancer	Squamous cell carcinoma of the cervix
Burkitt lymphoma	Adenocarcinoma of the cervix	Hodgkin's lymphoma
	Non-Hodgkin's lymphoma	Osteogenic carcinoma
	Ewing's sarcoma	Nongenital rhabdomyosarcoma
		Wilm's tumor

Recentemente è stata proposta da Abir una tecnica di preservazione della fertilità nelle pazienti di età compresa fra 2 e 18 anni che combina la crioconservazione del tessuto ovarico con la maturazione in vitro degli ovociti immaturi. In questo studio viene fatto un confronto tra caratteristiche del tessuto ovarico prelevato prima della chemioterapia e tessuto ovarico prelevato in donne che avevano già eseguito la chemioterapia. I risultati sono stati i seguenti: il numero di ovociti maturi nel tessuto prelevato è risultato significativamente più alto nelle pazienti che avevano crioconservato il tessuto pre-chemio; il numero di ovociti maturi prelevati era direttamente correlato ai valori di AMH prechirurgia in entrambi i gruppi. Inoltre in entrambi i gruppi è risultato un alto tasso di ovociti atresici correlato probabilmente all'insufficiente stimolo gonadotropinico. Ad oggi poco è conosciuto sulle capacità di sviluppo degli ovociti nelle pazienti pediatriche e sulla loro capacità di fertilizzazione. (Abir, 2016).

Sebbene questa tecnica di preservazione della fertilità sia in rapida diffusione è ancora considerata sperimentale e dovrebbe essere attuata solo in centri con adeguate competenze di crioconservazione ma soprattutto con un'organizzazione in grado di offrire le più sensibili e aggiornate tecniche di analisi istologica del tessuto prima del reimpianto.

Per questi motivi, sebbene sono sempre più numerosi i centri Italiani che hanno un programma di crioconservazione del tessuto ovarico (che viene proposto anche in casi di patologie non oncologiche) nelle pazienti oncologiche, la criopreservazione di tessuto ovarico andrebbe limitata a pochi Centri di riferimento.

Per le pazienti a cui non è possibile reimpiantare tessuto ovarico per l'elevato rischio metastatico potrebbe in futuro essere possibile maturare in vitro i follicoli isolati dal tessuto ovarico prelevato e crioconservato e ottenere da questi follicoli, ovociti da utilizzare in tecniche di PMA (Telfer, 2013).

Delle sette pazienti che si sono sottoposte a reimpianto di tessuto ovarico in un unico Centro Israeliano di riferimento, tutte hanno ripreso la ciclicità mestruale e 5 (57%) hanno concepito con IVF.

In conclusione, la tecnica dovrebbe essere proposta in casi selezionati a pazienti giovani che non possono effettuare la criopreservazione di ovociti e che devono effettuare terapie con elevato rischio gonadotossico (AIOM, 2016)



6. CONFRONTO TRA LE DIVERSE TECNICHE DI PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ NELLA DONNA

Tecniche a confronto	VANTAGGI	SVANTAGGI
Agonisti Gn Rh	• Semplice • Non invasiva • Basso costo • Senza effetti collaterali	• Solo per chemioterapia • Non protettiva per Chemio aggressive
Trasposizione ovarica	• Protegge le ovaia dalle radiazioni	• Invasiva • Solo per radioterapia • Può causare alterazioni anatomiche di tuba e ovaio
Crioconservazione degli embrioni	• Dal 1995 valido metodo per tutela fertilità	• Necessità di partner • Problemi etici
Crioconservazione del tessuto ovarico	• Applicabile in età pediatrica • Non presuppone stimolazione ormonale • Facile esecuzione	• Invasiva • Sperimentale nell'uomo • Rischio di trapiantare cellule neoplastiche
Crioconservazione degli Ovociti	• Applicabile anche in età prepubere • Non necessita di partner • Possono essere utilizzati dopo remissione di malattia	• Necessaria stimolazione con Gonadotropine • Tecnica invasiva • Ritarda di circa 2-3 settimane l'inizio delle terapie
Chirurgia Fertility Sparing	• Metodo efficace per tutela della fertilità • Efficace nella gestione delle patologie oncologiche • Invasività ridotta	• In alcuni casi (BOT) implica maggior rischio di recidive • Necessario team addestrato (ecografista, chirurgo, patologo)

7. METODICHE DI TUTELA DELLA FERTILITÀ NELL'UOMO

Dai dati oggi disponibili, la crioconservazione del seme rappresenta la strategia di prima scelta per la preservazione della fertilità nei giovani pazienti che devono sottoporsi a trattamenti antitumorali. Altre tecniche possibili sono la crioconservazione di spermatozoi ottenuti da prelievo di tessuto testicolare o la criopreservazione di tessuto testicolare e successivo reimpianto (Tabella 11).

A differenza di quanto succede nella donna, nell'uomo il ricorso a queste tecniche, se adeguatamente programmato, non comporta un ritardo nell'inizio del trattamento antitumorale.

Tabella 11. Tecniche di tecniche di preservazione della fertilità nell'uomo (AIOM 2016).

TECNICA	DEFINIZIONE	COMMENTI
Criopreservazione del seme dopo masturbazione (St)	Congelamento del seme dopo masturbazione.	Rappresenta la tecnica più consolidata per preservare la fertilità nell'uomo; importanti studi di coorte in pazienti oncologici.
Criopreservazione del seme ottenuto attraverso metodi alternativi di raccolta (St)	Congelamento del seme ottenuto attraverso aspirazione o estrazione testicolare, elettroeiaculazione sotto sedazione, o da un campione di urine ottenuto dopo masturbazione.	Piccole serie di casi e case report.
Schermatura gonadica durante radioterapia (St)	Utilizzo di appropriate schermature per ridurre la dose di radiazioni ricevuta dal testicolo.	Serie di casi.
Criopreservazione di tessuto testicolare: xenotrapianto testicolare; isolamento degli spermatogoni (Sp)	Congelamento di tessuto testicolare o cellule della linea germinale e successivo reimpianto dopo i trattamenti antitumorali o maturazione in animali.	Non ancora testato nell'uomo; testato con successo negli animali.
Soppressione testicolare con analoghi LHRH o antagonisti (Sp)	Utilizzo di terapie ormonali per proteggere il tessuto testicolare durante chemioterapia o radioterapia.	Studi clinici non dimostrano l'efficacia di questa tecnica.

St: standard; Sp: sperimentale

Al contrario della donna, nell'uomo, la protezione gonadica attraverso la manipolazione ormonale non risulta efficace; d'altra parte la crioconservazione del tessuto testicolare o degli spermatogoni con reimpianto e lo xenotrapianto testicolare sono in fase di sperimentazione e non sono ancora stati testati con successo nell'uomo.

7.1 Crioconservazione del seme

La crioconservazione del seme rappresenta un formidabile strumento per i pazienti che si sottopongono a trattamenti medici o chirurgici potenzialmente in grado di indurre sterilità, in particolar modo in campo oncologico. La procedura, se correttamente pianificata all'interno del percorso terapeutico, può essere eseguita in tempi relativamente rapidi. Pertanto, non gravando sui tempi di inizio delle terapie antineoplastiche, dovrebbe essere offerta a tutti gli uomini prima di iniziare trattamenti chirurgici, chimici o radianti, potenzialmente gonadotossici.

L'idea di crioconservare il seme risale già ai secoli scorsi e fu tentata per primo da Lazzaro Spallanzani nel 1776 utilizzando della neve, mentre Paolo Mantegazza nel XIX secolo ebbe per primo l'idea di una banca del seme dedicata ai militari in guerra per assicurare loro una prole.

Ma solo intorno agli anni '50 iniziò l'era della moderna criobiologia con l'introduzione e l'utilizzo delle sostanze crioprotettrici e dell'azoto liquido, ottenendo i primi successi in termine di gravidanze e la diffusione in tutto il mondo delle Banche del Seme (Sherman JF 1990).

La Banca del Seme è la struttura sanitaria deputata all'esecuzione della crioconservazione ed il suo compito è caratterizzato dalla doppia finalità di preservare la fertilità del paziente e di permettere l'accesso alle tecniche di riproduzione assistita. Le patologie tumorali che vengono riscontrate nei pazienti che crioconservano il proprio seme sono principalmente rappresentate dalle neoplasie che colpiscono più frequentemente i maschi in età fertile, in particolare, i tumori testicolari ed i linfomi Hodgkin e non-Hodgkin (Gandini et al 2003).

Vista l'importanza della sfera riproduttiva in pazienti, molto spesso giovani e senza prole, è indispensabile che tale possibilità venga consigliata dagli specialisti e che ogni regione si attrezzi per assicurare tale opzione nel modo più rapido ed efficiente possibile. Nella pratica clinica è fondamentale informare il paziente neoplastico di questa possibilità in caso di terapie che possono ledere in modo irreversibile la capacità fecondante. Ancora oggi, tuttavia, si stima che a molti pazienti non venga proposto il deposito del liquido seminale.

In caso di patologie neoplastiche testicolari la tempistica utile per una corretta crioconservazione è quello antecedente all'orchiectomia oppure fra l'intervento di orchiectomia e l'inizio della chemio o radioterapia. L'atteggiamento ottimale consiste nell'offrire al paziente la possibilità di eseguire la crioconservazione in entrambi questi momenti, soprattutto nei casi in cui il testicolo non coinvolto dalla neoplasia mostri segni clinici di sofferenza per minimizzare il rischio di crioconservare un campione di scarsa qualità. Come regola generale, in ogni caso, in tutte le patologie tumorali il deposito del seme deve essere comunque eseguito prima di qualunque terapia che possa interferire con la spermatogenesi e, soprattutto, con l'integrità del genoma.

Infatti, i diversi trattamenti antineoplastici possono indurre effetti mutageni nelle cellule germinali maschili a diversi stadi di maturazione. Tuttavia, ad oggi non esistono parametri che permettano di predire l'entità del danno genomico, il potenziale effetto teratogeno e gli effetti a lungo termine su fertilità e progenie di queste terapie. Tali problematiche sono, invece, di notevole interesse per i pazienti, che frequentemente pongono numerosi quesiti in merito al proprio medico curante.

Inoltre, benché in molti pazienti avvenga il recupero della spermatogenesi, soprattutto in caso di terapie antiblastiche meno gonadotossiche come la PEB per i tumori testicolari e l'ABVD per i linfomi di Hodgkin, fino al 3% dei pazienti sottoposti a chemioterapia e fino al 6% dei pazienti sottoposti a radioterapia rimangono in azoospermia e, pertanto devono poter contare sul seme crioconservato per poter sperare in una futura fertilità (Gandini et al 2006).

Per quanto riguarda le lesioni del DNA nemaspermico, invece, possono indurre mutazioni con conseguenti anomalie nella gravidanza e patologie genetiche nella progenie (Marchetti et al 2015), poiché gli spermatozoi affetti da tale danno possono comunque essere in grado di indurre gravidanza. Il danno al DNA nemaspermico può essere indotto anche dopo un solo ciclo di trattamento (Wyrobek, 2005; De Mas, 2001). Lo studio di Martinez e Brugnon (Martinez, 2016) mostra tuttavia, come in un campione di pazienti affetti da patologie neoplastiche ematologiche (linfoma di Hodgkin e non Hodgkin) ancor prima di essere sottoposti a trattamenti antineoplastici ci sia un maggior tasso di aneuploidia spermatica rispetto al gruppo di controllo sano.

Un recente lavoro ha analizzato i parametri seminali e l'integrità cromatinica nemaspermica pre e post trattamento di un'ampia coorte di pazienti affetti da tumore testicolare, evidenziando che il danno al DNA post terapia è influenzato anche dalla tipologia di trattamento. In particolare, dopo chemioterapia, è stato evidenziato, un marcato aumento di danno al DNA tra i 3 ed i 6 mesi con una successiva attenuazione dopo circa un anno dalla terapia, indicando un evidente

miglioramento dell'assetto cromatinico. Dopo radioterapia, invece, la frammentazione del DNA aumentava a 3 e 6 mesi post trattamento, ma la diminuzione era molto meno evidente tornando ai valori basali solo dopo 12-24 mesi dalla fine della terapia (Paoli et al 2015). Ancora in questo caso, appare chiaro il ruolo fondamentale dell'utilizzo del seme crioconservato pre terapia al fine di evitare la trasmissione del danno genetico indotto dalle terapie antiblastiche.

Va comunque sottolineato che il prelievo crioconservato non necessariamente sarà utilizzato, come per tutti i pazienti che recuperano la fertilità al termine dei trattamenti antineoplastici, viceversa se il paziente rimane sterile potrà utilizzare il campione anche dopo molti anni dalla crioconservazione.

Ferrari et al. in una recente revisione della letteratura, riporta che il tasso di ritiro e di utilizzo dei campioni seminali crioconservati in una Banca del Seme è relativamente ridotto, assestandosi attorno all'8%. Tuttavia, la percentuale cumulativa delle coppie che ottiene una gravidanza tramite fecondazione assistita con seme crioconservato è di circa il 49% (Ferrari et al. 2016).

Infine, oltre ai chiari benefici relativi alla preservazione della fertilità, i pazienti oncologici in età fertile possono trovare nella crioconservazione del seme un notevole sostegno psicologico per affrontare le varie fasi dei protocolli terapeutici (Dohle et al. 2010). I progressi nella terapia anti-neoplastica e le sempre più sofisticate tecniche di Fecondazione Assistita hanno aperto nuove possibilità riproduttive per il maschio infertile e, quindi, la crioconservazione del seme si impone anche nei casi di liquidi seminali gravemente alterati che non avrebbero avuto nessuna possibilità di fecondare in epoca pre-ICSI (Mortimer D. 2004). Le percentuali di gravidanza ottenute utilizzando liquido seminale criopreservato, sono illustrate nella tabella 12.

Tabella 12. Risultati ottenuti con seme crioconservato in pazienti oncologici nelle varie tecniche di riproduzione assistita (AIOM, 2016)

AUTORE	N° CICLI	N° COPPIE	IUI	IVF	ICSI
Kelleher et al. 2001 [163]	91	60	11/35 (31.4%)	6/28 (21.4%)	12/28 (42.8%)
Ragni et al. 2003 [157]	88	28	3/40 (7.5%)	0/6 (0%)	11/42 (26.2%)
Schmidt et al. 2004 [164]	151	67	4/24 (16.7%)	-	19/49 (34.7%)
Agarwal et al. 2004 [165]	87	29	7/42 (7%)	5/26 (19%)	4/19 (21%)
Revel et al. 2005 [170]	62	21	5.9	-	42%
Mesequer et al. 2006 [171]	35	-	1/5 (20%)	-	15/30 (50%)
Hourvitz et al. 2008 [166]	169	118 + 54	-	13/54 (24.1%)	85/169 (50.3%)
Van Casteren et al. 2008 [167]	101	37	1/7 (14%)	8/32 (25%)	16/53 (30%)
Freour et al. 2011 [168]	178	-	8/66 (12%)	-	26/112 (23.2%)
Crha et al. 2009 [172]	44	28	-	-	29.5%
Bizet et al 2012 [169]	127	-	5/39 (12.8%)	2/7 (12.8%)	23/71 (32.4%)
Botchan et al. 2014 [173]	148	62	9/81 (11.1%)	0/12	34/91 (37.6%)

IUI: Inseminazione intrauterina; IVF Fertilizzzione in vitro e embryo transfer; ICSI: Inseminazione intracitoplasmatica di ovocita e trasferimento di embrioni in utero.
NB: le percentuali di gravidanza sono espresse per ciclo e non per paziente.

7.2 Modalità di effettuazione della crioconservazione

Le modalità di crioconservazione e l'attività di una Banca del Seme sono strettamente regolamentate dalle normative vigenti nei singoli Paesi della Comunità Europea, che consistono nel recepimento da parte dei vari stati della direttiva 2004/23/CE e seguenti (2006/17/CE e 2006/86/CE), emanate dal Parlamento Europeo e dal Consiglio per quanto riguarda le "prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umane". Essenzialmente, viene posta particolare attenzione agli aspetti procedurali e di sicurezza per quello che riguarda la donazione/conservazione ed il controllo dei gameti, nonché quanto riguarda la codifica dei dati biologici, la lavorazione dei campioni, lo stoccaggio e l'eventuale trasferimento dei campioni. Inoltre, una Banca del Seme ed

il suo personale deve rispettare precisi criteri strutturali e funzionali, finalizzati alla salvaguardia ed alla sicurezza del materiale crioconservato, alla sicurezza dei lavoratori addetti e dei dati clinici, biologici e di identificazione/rintracciabilità dei campioni.

Un primo aspetto essenziale della crioconservazione è la conoscenza dello status infettivologico del campione. Oltre alle implicazioni relative alla tecnica di fecondazione assistita utilizzata, i virus epatite B e C, HIV e Citomegalovirus si possono teoricamente trasmettere attraverso l'azoto liquido in cui vengono conservati i campioni seminali (Bielanski 2012).

Pertanto, è necessario che l'oncologo e/o il clinico che abbia in carico il paziente lo faccia sottoporre alle indagini di laboratorio appropriate per escludere la presenza di tali virus (HBsAg, HBsAb, HBcAb, anticorpi anti HCV, anticorpi anti CMV IgG ed IgM, anticorpi anti HIV). Tali esami devono essere eseguiti non oltre tre mesi prima della crioconservazione del seme e devono essere disponibili al momento della crioconservazione. È opportuno, inoltre, che il paziente osservi un periodo di astinenza dai rapporti sessuali di 3-5 giorni. Tale indicazione può, ovviamente, essere ignorata qualora la terapia antineoplastica debba essere iniziata urgentemente. Per motivi medico-legali la raccolta del campione seminale deve avvenire presso la Banca del Seme. Al paziente viene consegnato un contenitore sterile, contrassegnato con il suo nome e cognome o con un codice identificativo, in cui deve raccogliere il campione seminale per masturbazione. Il paziente deve compilare e sottoscrivere un modulo di consenso informato che regolerà il suo rapporto con la Banca del Seme. Il campione di liquido seminale crioconservato potrà essere ritirato solo dalla persona che lo ha prodotto, previa presentazione d'idoneo documento d'identità.

7.3 Crioconservazione di tessuto testicolare

Può accadere che il paziente a causa di pregresse patologie e/o endocrinopatie o a causa della stessa patologia neoplastica, risulti azoospermico all'esecuzione dell'analisi seminale. In questi casi, soprattutto se il paziente è affetto da una azoospermia ostruttiva, è possibile ricercare gli spermatozoi da crioconservare direttamente nel tessuto testicolare. In questi casi, che in letteratura ammontano a circa il 10-15% del totale, ciò è possibile tramite chirurgia testicolare (TESE – Testicular sperm extraction). Generalmente in corso di orchiectomia per motivi oncologici, è possibile in corso dello stesso intervento rimuovere delle porzioni di parenchima sano per effettuare il recupero di spermatozoi da poter crioconservare in vista del futuro ricorso a tecniche di fecondazione assistita. Questo approccio ha permesso di ottenere gravidanze da pazienti azoospermici affetti da neoplasie testicolari. Tuttavia in caso di forme di azoospermia non ostruttiva è possibile che le biopsie casuali di parenchima non portino al ritrovamento di spermatozoi. Per poter mirare le biopsie ad aree di parenchima contenenti spermatozoi è possibile utilizzare un approccio microchirurgico con microscopio al tavolo operatorio (microdissection TESE- microTESE) (Haddad et al. Fert Ster 2014). Spesso tuttavia l'approccio microchirurgico è sconsigliato in caso di pazienti oncologici, poiché la micromanipolazione del parenchima testicolare potrebbe alterare la stadiazione della neoplasia.

L'efficacia della crioconservazione di spermatozoi come strategia per preservare la fertilità nei pazienti che devono sottoporsi a terapie gonadotossiche è stata dimostrata da molti lavori che riportano i risultati ottenuti con l'utilizzo del seme scongelato in cicli di riproduzione assistita ("intrauterine insemination/in vitro fertilisation" [IUI/IVF] e ICSI), come illustrato nella tabella. Nei pazienti prepuberi ad oggi non esiste una tecnica di preservazione della fertilità riconosciuta in quanto la spermatogenesi si attiva con la pubertà e quindi la crioconservazione del liquido seminale non è attuabile. È stato eseguito uno studio su primati (18 adulti e 5 prepuberi) sottoposti a prelievo di cellule staminali testicolari e successivamente a trapianto autologo che ha dimostrato in 3 primati prepuberi la produzione di spermatozoi vitali. Questo studio potrebbe fornire una possibilità da sperimentare anche a livello umano (Hermann, 2012).

7.4 Soppressione testicolare con analoghi del GnrH

La protezione gonadica con analoghi del GnRh nell'uomo non ha dimostrato efficacia nella tutela della fertilità soprattutto quando usata con chemioterapici altamente gonadotossici (Waxman, 1987). Questa metodica trova il razionale nell'ipotesi che il danno dei chemioterapici sulle cellule germinali sia dovuto alla loro intensa attività replicativa. Gli agonisti del GnRH, che hanno maggiore emivita e potenza maggiore del GnRH nativo, producono inizialmente una stimolazione delle cellule ipofisarie; tuttavia la loro azione continua porta successivamente ad una desensibilizzazione e quindi ad una down-regulation dell'asse ipofisi-gonade, riducendo quindi la secrezione di FSH e LH e conseguentemente la funzione gonadica. Tuttavia, in molti esperimenti condotti sugli animali, anche sopprimendo la funzione testicolare attraverso gli analoghi del GnRH non è stato comunque possibile ottenere l'assenza di danno a carico delle cellule germinali durante trattamenti chemio- e radioterapici. Pertanto, in considerazione di tale quadro, tale metodica non risulta attualmente indicata, essendo la crioconservazione dei gameti altamente affidabile e sicura per il paziente (Leader 2011).



8. ISTITUTI AUTORIZZATI E METODI DI INDIVIDUAZIONE

8.1 Percorso per l'individuazione delle banche autorizzate, compiti

8.1.1 Strutture deputate alla conservazione della fertilità

Le banche, intese come centri di conservazione dei gameti e dei tessuti ovarico o testicolare, possono essere inserite in Centri di fecondazione assistita (e quindi oltre alla crioconservazione dei gameti/tessuti testicolare anche il successivo utilizzo può avvenire nell'ambito della stessa struttura), oppure essere strutture autonome, dedicate solo ed unicamente alla preservazione della fertilità di pazienti affetti da patologie che richiedono trattamenti potenzialmente sterilizzanti.

In ogni caso la Banca dovrà consentire la crioconservazione senza scadenza temporale e garantire, quindi, ai pazienti, anche giovanissimi, una potenzialità riproduttiva fino a molti anni dopo la raccolta.

Le Banche devono essere strutture di riferimento per tutti i Centri oncologici ed ematologici e poiché rappresentano un impegno gestionale e organizzativo molto complesso devono essere inserite in IRCCS, Aziende Universitarie o Ospedaliere pubbliche o convenzionate. La configurazione territoriale dovrebbe prevedere la realizzazione di un definito e limitato numero di Banche regionali o interregionali, in funzione della densità della popolazione e dell'incidenza di patologie neoplastiche o che richiedono preservazione della fertilità.

8.1.2 Criteri per l'individuazione delle banche

I criteri di individuazione e autorizzazione delle banche per la conservazione di gameti e tessuti si devono basare su requisiti specifici organizzativi e tecnologici, su idonee misure di sicurezza e qualità, su volumi di attività minimi accettabili e di esperienza pregressa e sul controllo degli esiti.

Di seguito sono elencati i criteri per l'individuazione da parte delle Regioni della banca di conservazione **(tali criteri non si riferiscono alle attività di crioconservazione svolte nei centri di PMA conformi ai requisiti di cui ai decreti legislativi n. 191/2007 e n. 16/2010):**

a. deve essere situata in IRCCS, Aziende Universitarie o Ospedaliere pubbliche o convenzionate, individuati dalla Regione e periodicamente ispezionata per la conformità ai requisiti di qualità e sicurezza previsti nei D. Lgs. 191/2007 e 16/2010, nonché alle Linee Guida del CNT per la gestione delle sale criobiologiche, così come previsto agli art. 6 e 7 del D. Lgs. 191/2007.

b. deve garantire un servizio dedicato e continuo con un'adeguata numerosità di personale;

c. deve possedere un'esperienza pregressa di almeno 2 anni nella lavorazione e crioconservazione della tipologia specifica di gameti e/o tessuti;

d. deve disporre di procedure convalidate per la lavorazione e conservazione dei gameti;

e. per la lavorazione e conservazione del tessuto ovarico, deve essere data evidenza dell'effettuazione di prove di validazione delle procedure e dei protocolli adottati, anche con pregressa attività di ricerca e sperimentazione;

f. deve mantenere, dopo il primo anno di attività, un volume minimo di stoccaggio e crioconservazione di almeno 200 campioni/anno di ovociti e/o embrioni e di almeno 100 campioni/anno di liquido seminale e/o tessuto testicolare;

g. deve raccogliere il follow-up a breve termine dei pazienti, in caso di riutilizzo dei materiali biologici.

Considerata la % di pazienti candidabili alla preservazione della fertilità e l'incidenza delle patologie nella popolazione, si raccomanda che una banca degli ovociti e del tessuto ovarico venga istituita ogni 5 milioni di abitanti e del liquido seminale/tessuto testicolare ogni 5 milioni di abitanti, restando salva la possibilità di istituire una banca, in presenza di particolari condizioni logistiche, anche qualora la regione o la provincia autonoma abbiano un numero di abitanti inferiore ai 5 milioni.

8.2 Requisiti di qualità e sicurezza della banca di crioconservazione

Tutti quelli previsti nei D. lgs. 191/2007 e 16/2010, nonché le linee guida del cnt per la gestione delle sale criobiologiche in vigore. Il possesso di detti requisiti viene periodicamente verificato ai sensi dell'all. 7 del D. lgs. 191/2007.

Di seguito vengono richiamati alcuni requisiti ulteriori a quelli previsti nei citati decreti, specifici per il settore:

8.2.1 Organizzazione della Banca

Salvo il caso in cui la struttura si configuri come centro PMA, identificazione di un Responsabile che soddisfi le seguenti condizioni e possieda le seguenti qualifiche minime:

- Banche di gameti/tessuto ovarico femminili: il Responsabile deve essere in possesso di un diploma di laurea in medicina e specializzazione in Ginecologia e Ostetricia e di esperienza pratica di almeno due anni nel settore. Il Responsabile della Banca è affiancato almeno da un biologo o un biotecnologo o un medico con esperienza in conservazione di ovociti/tessuto ovarico, Responsabile di laboratorio, che gestisce tutti gli aspetti di specifica competenza laboratoristica, con almeno due anni di esperienza pratica nel settore.
- Banca del seme/tessuto testicolare: il Responsabile deve essere in possesso di un diploma di laurea in medicina e specializzazione in Endocrinologia e Malattie del metabolismo e avere almeno due anni di esperienza nel settore. Il Responsabile della Banca è affiancato almeno da un biologo o un biotecnologo o un medico con esperienza in conservazione del liquido seminale/tessuto testicolare, Responsabile di laboratorio, che gestisce tutti gli aspetti di specifica competenza laboratoristica, con almeno due anni di esperienza pratica nel settore.
- Il Responsabile della Banca può anche essere un Biologo, con esperienza pratica di almeno due anni nel settore. In questo caso, dovrà essere identificato un laureato in medicina e specializzazione in Ginecologia e Ostetricia (per la banca di conservazione di gameti femminili/tessuto ovarico) o specializzazione in Endocrinologia e Malattie del metabolismo (per la banca di conservazione di gameti maschili/tessuto testicolare) quale responsabile delle attività cliniche e mediche della Banca.

8.2.2 Sistema di Gestione della Qualità

La Banca deve applicare e mantenere un sistema documentato di gestione della qualità, per il quale deve essere nominato un responsabile, non direttamente coinvolto nelle attività della banca.

Il sistema di gestione della qualità deve comprendere almeno un manuale e/o procedure operative standard (POS) che descrivano tutte le attività critiche, comprese le politiche per la qualità, i manuali di formazione del personale, schede per la gestione della strumentazione/attrezzature, e deve prevedere inoltre documenti, moduli, schede e registrazioni.

Rintracciabilità

Per tutto il percorso, dal momento dell'inserimento del paziente nel percorso di preservazione fino al possibile riutilizzo futuro dei gameti/tessuti conservati, dovrà essere garantita la totale

tracciabilità per ogni fase della pratica clinica e biologica, compreso il prelievo/raccolta, traporto, conservazione di tutto il materiale e reagenti venuti a contatto con i gameti/tessuti, gli operatori che hanno effettuato le procedure, gli strumenti utilizzati. Deve inoltre essere tracciato anche l'eventuale riutilizzo dei gameti/tessuti.

Screening per patologie infettive

Prima di procedere alla conservazione dei gameti/tessuto ovarico/tessuto testicolare i pazienti devono aver effettuato i test per ricerca di:

- anticorpi anti virus HIV 1 e 2;
- anticorpi anti virus dell'epatite C (HCV);
- antigene di superficie del virus dell'epatite B (HBsAg e HBcAb).

I test devono essere effettuati al momento della raccolta/prelievo dei materiali, oppure, se non è possibile, entro 7 giorni dalla donazione (si tratta del «campione della donazione»).

Ulteriori test specifici possono essere richiesti in caso di provenienza del donatore da aree geografiche endemiche per altre patologie infettive.

Strutture

Requisiti per la processazione

La lavorazione di gameti, tessuto ovarico e tessuto testicolare deve avvenire sotto cappa a flusso laminare (classe A) con un ambiente di fondo che abbia una qualità dell'aria equivalente almeno al grado D di cui all' allegato 1 della Guida europea alle buone pratiche di fabbricazione (Good Manufacturing Practice- GMP).

Nelle strutture in cui sono accettati gameti e tessuti da donatori infetti da HIV, HBV o HCV, le lavorazioni devono essere effettuate separatamente e devono essere attivate efficaci procedure di pulizia straordinaria delle superfici utilizzando, per esempio, prodotti validati per l'inattivazione virale.

Criopreservazione e stoccaggio

In caso di lavorazione e crioconservazione con impiego di azoto liquido devono essere osservate tutte le misure atte a garantire la sicurezza del personale e dei gameti/tessuti conservati conformemente alle Linee Guida CNT per la sala criobiologica di un Istituto dei Tessuti in vigore.

Ogni banca deve dotarsi di apparecchiature idonee dedicate per effettuare la crioconservazione e lo stoccaggio, i parametri critici devono essere controllati e monitorati.

I campioni dei soggetti risultati negativi per epatite B, epatite C ed HIV devono essere conservati in contenitori differenti da quelli contenenti campioni positivi o di cui manca una documentazione di negatività.

8.3 Informazioni ai cittadini

a. Dovrà essere istituito un sistema di contatto a livello regionale con i cittadini/pazienti per ricevere informazioni e chiarimenti sul percorso. A questo scopo dovrà essere istituito un numero telefonico dedicato e un indirizzo email specifico. Il numero telefonico, situato in una struttura pubblica, disponibile in orario d'ufficio, deve essere in grado di dare ai cittadini le seguenti indicazioni:
   - informazioni di carattere generale sulle possibilità e sul significato delle tecniche di oncofertilità;

- informazioni sui servizi di oncologia che, a seconda delle patologie, possano, a seguito di una specifica diagnosi, indirizzare i pazienti verso una corretta conservazione dei gameti;
- informazioni sulle banche in grado di conservare correttamente i gameti femminili e maschili -contatti via mail con esperti di oncofertilità e di conservazioni dei gameti.

Verrà inoltre creato di un sito/pagina web informativa, dove il paziente potrà trovare le informazioni necessarie sulle patologie trattate, sulle strutture, sulle banche, sulla tipologia di attività svolta.

b. Il Percorso per la Preservazione della fertilità dovrà disporre di un sistema di prenotazione dedicato con disponibilità per consulenza specialistica al paziente entro 72 ore.

c. Dovranno essere previsti sistemi di monitoraggio della soddisfazione dei pazienti e modalità per la gestione di eventuali reclami/segnalazioni.

8.4 Normativa europea e nazionale di riferimento

1. DIRETTIVA 2004/23/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 31 marzo 2004 sulla definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.
2. DIRETTIVA 2006/17/CE DELLA COMMISSIONE dell'8 febbraio 2006 che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda determinate prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani.
3. DIRETTIVA 2000/86/CE DELLA COMMISSIONE del 24 ottobre 2006 che attua la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni avverse ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.
4. DIRETTIVA 2012/39/UE DELLA COMMISSIONE del 26 novembre 2012 che modifica la direttiva 2006/17/CE per quanto riguarda determinate prescrizioni tecniche relative agli esami effettuati su tessuti e cellule umani.
5. D.Lgs. 6/11/07 n. 191 Attuazione della direttiva 2004/23/CE sulla definizione delle norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.
6. D.Lgs. 25/01/10 n. 16 Attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE per quanto riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.
7. D.Lgs. 30/05/12 n. 85 Modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 25 gennaio 2010, n. 16, recante attuazione delle direttive 2006/17/CE e 2006/86/CE, che attuano la direttiva 2004/23/CE per quanto riguarda le prescrizioni tecniche per la donazione, l'approvvigionamento e il controllo di tessuti e cellule umani, nonché per quanto riguarda le prescrizioni in tema di rintracciabilità, la notifica di reazioni ed eventi avversi gravi e determinate prescrizioni tecniche per la codifica, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.

8. Legge 01/04/99 n. 91 Disposizioni in materia di prelievi e di trapianti di organi e tessuti.
9. D.Lgs. 81/08 e norme collegate relative alla tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro.
10. D.Lgs. 196/03 Codice in materia di protezione dei dati personali.
11. Decreto 10/10/2012 Modalità per l'esportazione o l'importazione di tessuti, cellule e cellule riproduttive umani destinati ad applicazioni sull'uomo, così come modificato dal D.M. 29/07/2015.
12. D.P.R. 15/07/03 n. 254 Regolamento recante disciplina della gestione dei rifiuti sanitari a norma dell'articolo 24 della Legge 31 luglio 2002, n. 179.
13. Linee guida per la sala criobiologica di un istituto dei tessuti, Centro Nazionale Trapianti, novembre 2014
14. Guide to the quality and safety of Tissues and Cells for human application, EDQM 2nd edition 2015
15. UNI EN ISO 14644-1:2001 Camere bianche ed ambiente associato controllato. Classificazione della pulizia dell'aria.
16. UNI EN ISO 14644-2:2001 Camere bianche ed ambienti associati controllati - Specifiche per la prova e la sorveglianza per dimostrare la conformità continua con la UNI EN ISO 14644-1.
17. UNI EN ISO 14644-3:2006 Camere bianche ed ambienti associati controllati parte 3: metodi di prova.
18. UNI EN ISO 14644-4:2004 Camere bianche ed ambienti associati controllati. Parte 4: progettazione, costruzione e avviamento.
19. UNI EN ISO14698-1:2004 Camere bianche ed ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione parte 1: principi generali e metodi.
20. UNI SPERIMENTALE 10127-1:1992 Guida per la definizione degli intervalli di taratura di strumenti per misurazione: criteri generali.
21. UNI SPERIMENTALE 10127-2:1992 Guida per la definizione degli intervalli di taratura di strumenti per misurazione: intervalli consigliati per misurazioni lineari, angolari e geometriche.
22. EC GUIDE TO MANUFACTURING PRACTICE - REVISION TO ANNEX 1. Title: Manufacture of Sterile Medicinal Products – February 2008.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Abir R, Ben-Aharon I, Garor R, Yaniv I Ash S Stemmer SM, Ben-Haroush A, Freud E, Kravarusic D, Sapir O, Fisch B. Cryopreservation of in vitro matured oocytes in addition to ovarian tissue freezing for fertility preservation in paediatric female cancer patients before and after cancer therapy. Hum Reprod. 2016 Apr;31(4):750-62.
2. AIOM, 2016 Linee guida Preservazione della fertilita' nei pazienti oncologici edizione 2016.
3. Alvarez M, Solé M, Devesa M, Fábregas R, Boada M, Tur R, et al. Live birth using vitrified warmed oocytes in invasive ovarian cancer: case report and literature review. Reprod Biomed Online. 2014;28(6):663-8
4. Armuand G M., Rodriguez-Wallberg KA., WettergrenL, AhlgrenJ, Enblad G, HouglundM, and Lampic C Sex Differences in Fertility-Related Information Received by Young Adult Cancer Survivors J Clin Oncol. 30, 17: 2012
5. Ash P. The influence of radiation on fertility in man. Br. J. Radiol., 1980; 53:271.
6. Ataya KM, McKanna JA, Weintraub AM, et al. A luteinizing hormone-releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy-induced ovarian follicular loss in rats. Cancer Res 1985, 45(8):3651-3656.
7. Ataya K, Rao LV, Lawrence E, Kimmel R. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide-induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. Biol Reprod 1995, 52(2):365-372.
8. Azim AA, Costantini-Ferrando M, and Oktay K. Safety of Fertility Preservation by Ovarian Stimulation With Letrozole and Gonadotropins in Patients With Breast Cancer: A Prospective Controlled Study. Journal of clinical oncology. 2008; 26 (16): 2630-2635.
9. Azim HA Jr, Santoro L, Pavlidis N, et al. Safety of pregnancy following breast cancer diagnosis: a meta-analysis of 14 studies. Eur J Cancer 2011, 47:74-83.
10. Azim HA Jr, Kroman N, Paesmans M et al. Prognostic impact of pregnancy after breast cancer diagnosis: a meta-analysis of 14 studies. Eur J Cancer; 2013; 47:74-83.
11. Badawy A, Elnashar A, El-Ashry M, Shahat M. Gonadotropin-releasing hormone agonists for prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: prospective randomized study. Fertility and sterility 2009, 91(3):694-697.
12. Baker TG., Radiosensitivity of mammalian oocytes with particular reference to the human female. Am. J. Obstet. Gynecol., 1971;110:746.
13. Barton SE, Missmer, SA, Berry KF, Ginsburg ES. Female cancer surviors are lowresponders and have reduced success compared with other patients undergoing assisted reproductive technologies. Fertility and Sterility, 2012; 97: 381-386.
14. Bedoschi GM, de Albuquerque FO, Ferriani RA, Navarro PA. Ovarian stimulation during the luteal phase for fertility preservation of cancer patients: case reports and review of the literature. J Assist Reprod Genet.2010;27(8):491
15. Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. Theriogenology. 2012 Feb;77(3):467-82
16. Blumenfeld Z, Avivi I, Linn S, et al.: Prevention of irreversible chemotherapy- induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. Hum Reprod 1996, 11:1620 –1626.

17. Blumenfeld Z, Shapiro D, Shteinberg M, et al. Preservation of fertility and ovarian function and minimizing gonadotoxicity in young women with systemic lupus erythematosus treated by chemotherapy. Lupus 2000, 9:401– 405.

18. Blumenfeld Z. How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryo, oocytes or ovaries. Oncologist 2007, 12:1044-1054.

19. Blumenfeld Z, Avivi I, Eckman A, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist decreases chemotherapy-induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients with Hodgkin lymphoma. Fertil Steril 2008, 89:166-173.

20. Blumenfeld Z et al Gonadotropin-releasing hormone agonist cotreatment during chemotherapy may increase pregnancy rate in survivors. The Oncologist 2015; 20: 1283-1289.

21. Bokser L, Szende B, Schally AV. Protective effects of D-Trp6-luteinising hormone releasing hormone microcapsules against cyclophosphamide-induced gonadotoxicity in female rats. Br J Cancer 1990, 61:861-865.

22. Borini A, Levi Setti PE, Anserini P, De Luca R, De Santis L, Porcu E, La Sala GB, Ferraretti A, Bartolotti T, Coticchio G, Scaravelli G. Multicenter observational study on slow-cooling oocyte cryopreservation: clinical out come. Fertil Steril 2010.

23. Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Lailla JM, Balasch J 2001 Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. J Clin Endocrinol Metab 86:4489–4494.

24. Cao, Y.-X. & Chian, R.-C. Fertility preservation with immature and in vitro matured oocytes. Semin. Reprod. Med. **27,** 456–464 (2009).

25. Cardoso F, Sibylle L, Pagani O, Graziottin A, Panizza P, Martincich L, Gentilini O, Peccatori F et al. The European Society of Breast Cancer Specialists recommendations for the management of young women with breast cancer. European Journal of Cancer, 2012; 48: 3355-3377.

26. Castelo-Branco C, Nomdedeu B, Camus A, et al. Use of gonadotropin-releasing hormone agonists in patients with hodgkin's disease for preservation of ovarian function and reduction of gonadotoxicity related to chemotherapy. Fertil Steril 2007, 87:702-705.

27. Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Mazzocchi A, Venturoli S. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. Fertil Steril. 2009 Jun;91(6):2399-407.

28. Cobo A, Juan D, Garcia-Velasco A, Domingo J, Remohí J.Antonio Pellicer, 2013. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients? Fertil Steril. 2013; 99 (6), 1485-1495.

29. Cobo A, Serra V, Garrido N, Olmo I, Pellicer A, Remohí J, 2014. Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes. Fertil Steril. 2014; 102 (4): 1006-1015e4.

30. Coticchio, G., Dal-Canto, M., Guglielmo, M.-C., Mignini-Renzini, M. & Fadini, R. Human oocyte maturation in vitro. Int. J. Dev. Biol. **56,** 909–918 (2012).

31. Dalberg K, Eriksson J, Holmberg L. Birth outcome in women with previously treated breast cancer-a population –based cohort study from Sweden. PLoS Med 2006, 3(9):e336.

32. Da Motta EL, Bonavita M, Alegretti JR, Chehin M, Serafini P. Live birth after 6 years of oocyte vitrification in a survivor with breast cancer. J Assist Reprod Genet. 2014;31(10): 1397-400.

33. Del Mastro, Catzeddu T, Boni L, et al. Prevention of chemotherapy-induced menopause by temporary ovarian suppression with goserelin in young, early breast cancer patients. Ann Oncol 2006, 17:74-78.

34. Del Mastro L, Boni L, Michelotti A, et al. Effect of the gonadotropin-releasing hormone analogue triptorelin on the occurrence of chemotherapy-induced early menopause in premenopausal women with breast cancer: a randomized trial. JAMA 2011, 306(3):269-276.

35. De Mas, P. et al. Increased aneuploidy in spermatozoa from testicular tumour patients after chemotherapy with cisplatin, etoposide and bleomycin. Hum. Reprod. Oxf. Engl. 16, 1204–1208 (2001).

36. Dohle GR. Male infertility in cancer patients: Review of the literature Int J Urol. 2010 Apr; 17(4):327-31. Review

37. Dolmans, M.-M. et al. A review of 15 years of ovarian tissue bank activities. J. Assist. Reprod. Genet. 30, 305–314 (2013).

38. Donnez, J. et al. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. Fertil. Steril. **99,** 1503–1513 (2013).

39. Donnez J, dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique toward routine clinical practice. J Assist reprod Genet 2015, 32:1167-1170.

40. Donnez, J. & Dolmans, M.-M. Ovarian tissue freezing: current status. Curr. Opin. Obstet. Gynecol. **27,** 222–230 (2015).

41. Eman AFK, Mona HMA. Effect of a gonadotropin-releasing hormone analogue on cyclophosphamide-induced ovarian toxicity in adult mice. Arch Gynecol Obstet 2013; 287: 1023-1029

42. Fadini, R. et al. Comparison of the obstetric and perinatal outcomes of children conceived from in vitro or in vivo matured oocytes in in vitro maturation treatments with births from conventional ICSI cycles. Hum. Reprod. Oxf. Engl. 27, 3601–3608 (2012).

43. Feddy M.J, Godsen RG., Gougeon A., Richardson S.J., Nelson JF., accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implication for forecasting menopause. hum. reprod. 7,10. 1342-46. 1992.

44. Ferrari S, Paffoni A, Filippi F, Busnelli A, Vegetti W, Somigliana E. Sperm cryopreservation and reproductive outcome in male cancer patients: a systematic review. Reprod Biomed Online. 2016 Jul;33(1):29-38. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.04.002. Epub 2016 Apr 20.

45. Franke HR, Smit WM, Vermes I. Gonadal protection by a gonadotropin-releasing hormone agonist depot in young women with Hodgkin's disease undergoing chemotherapy. Gynecol Endocrinol 2005, 20:274-278.

46. Friedler, S., Koc, O., Gidoni, Y., Raziel, A. & Ron-El, R. Ovarian response to stimulation for fertility preservation in women with malignant disease: a systematic review and meta-analysis. Fertil. Steril. 97, 125–133 (2012).

47. Gandini L, Lombardo F, Salacone P, Paoli D, Anselmo AP, Culasso F, Dondero F, Lenzi A. Testicular cancer and Hodgkin's disease: evaluation of semen quality. Hum Reprod 18(4):796, 2003.

48. Gandini L, Sgrò P, Lombardo F, Paoli D, Culasso F, Toselli L, Tsamatropoulos P, Lenzi A. Effect of chemo- or radiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. Hum Reprod. 2006 Nov;21(11):2882-9. Epub 2006 Sep 22.

49. Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martinez M, Carmona L, Pellicer A, 2013. 5-years experience employing oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. Fertil Steril. 2013; 99(7): 1994-9.

50. Gerber B, von Minckwitz G, Stehle H, et al. German Breast Group Investigators. Effect of luteinizing hormone-releasing hormone agonist on ovarian function after modern adjuvant breast cancer chemotherapy: the GBG 37 ZORO study. J Clin Oncol 2011, 29(17):2334-2341.

51. Glujovski D, Riestra B, Sueldo C, Fiszbajn G, Repping S, Nodar F, et al. Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. Cochrane Database Syst Rev. 2014;9:CD010047.

52. Goldman KN, Noyes NL, Knopman JM, McCaffrey C, Grifo JA. Oocyte efficiency: does live birth rate differ when analyzing cryopreserved and fresh oocytes on a per-oocyte basis? Fertil Steril. 2013;100(3): 712-7.

53. Gosden R.G. Biology of menopause: The causes and consequences of ovarian ageing. Academic press London, 1985.

54. Gradishar W., Shilky R.L. Ovarian function following radiation and chemotherapy for cancer. Seminars in oncology 16,5. 425-36,1989.

55. Grynberg, M, Ren_e Frydman. Male fertility preservation: innovations and questions. Fertility and Sterility® Vol. 105, No. 2, February 2016 0015-0282

56. Haddad N, Al-Rabeeah K, Onerheim R, Zini A. Is ex vivo microdissection testicular sperm extraction indicated for infertile men undergoing radical orchiectomy for testicular cancer? Case report and literature review. Fertil Steril. 2014 Apr; 101(4):956-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.052. Epub 2014 Feb 12.

57. Haie-Meder, C. et al. Radiotherapy after ovarian transposition: ovarian function and fertility preservation. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **25,** 419–424 (1993).

58. Hermann BP, Sukhwani M, Winkler F, Pascarella JN, Peters KA, Sheng Y et al. Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. Cell Stem Cell 2012; 11:715–26.

59. Hokken-Koelega AC, Van der Lely AJ, Hauffa BP, Haeusler G, Johannsson G, Maghnie M, Argente J, DeSchepper J, Gleeson H, Gregory JW, Höybye C, Kalestimur F, Luger A, Muller H, Neggers S, Popovic-Brkic V, Porcu E, Savendahl L, Shalet S, Spiliotis BE, Tauber M. Bridging the gap: metabolic and endocrine care of patients during transition. Endocr Connect. 2016 Nov 1. pii: EC-16-0028.

60. Horning SJ., Hoppe RT., Kaplan HS., Rosenberg SA. Female reproductive potential after treatment for hodgkin's disease. The New Engl. J. of Medicine 304:1377-81, 1981

61. Jansson PO., Jansson I., Skrytene A., Dambler J., Lindstedt G. Ovarian endocrine function in young women undergoing radiotherapy for carcinoma of the cervix. Ginecol Oncol, 1981;11:218.

62. Kim MK, Lee DR, Han JE, Kim YS, Lee WS, Won HJ. Live birth with vitrified-warmed oocytes of a chronic myeloid leukemia patient nine years after allogenic bone marrow transplantation. J Assist Reprod Genet. 2011; 28: 1167–70.



63. ISFP Practice Committee, Kim SS, Donnez J, Barri P, Pellicer A, Patrizio P, Rosenwaks Z, Nagy P, Falcone T, Andersen C, Hovatta O, Wallace H, Meirow D, Gook D, Kim SH, Tzeng CR, Suzuki S, Ishizuka B, Dolmans MM. Recommendations for fertility preservation in patients with lymphoma, leukemia, and breast cancer. J Assist Reprod Genet. 2012 ;29(6):465-8

64. Lambertini M., Ceppi M., Poggio F., Peccatori F. A., Azim H. A. Jr, Ugolini D., Pronzato P., Loibl S., Moore H. C. F., Partridge A. H., Bruzz P. & Del Mastro L. Ovarian suppression using luteinizing hormonereleasing hormone agonists during chemotherapy to preserve ovarian function and fertility of breast cancer patients: a meta-analysis of randomized studies. Ann Oncol 26,12: 2015

65. Lambertini M., Del Mastro L. Cancer and fertility preservation: International recommendations from an expert meeting. BMC Medicine 14:1, 2016.

66. Lambertini M., Cinquini M., Moschetti I., Peccatori FA., Anserini P, Valenzano Menada M, Tomirotti M., Del Mastro L. Temporary ovarian suppression during chemotherapy to preserve ovarian function and fertility in breast cancer patients: A GRADE approach for evidence evaluation and recommendations by the Italian Association of Medical Oncology. . Eur J Cancer 71; 2017

67. Langagergaard V, Gislum M, Skriver MV, et al. Birth outcome in women with breast cancer. Br J Cancer 2006, 94:142-146.

68. Lawrenz B, Banys M, Henes M, et al. Pregnancy after breast cancer: case report and review of the literature. Arch Gynecol Obstet, 2011; 283(4):837-843.

69. Leader A, Lishner M, Michaeli J, Revel A. Fertility considerations and preservation in haemato-oncology patients undergoing treatment. Br J Haematol. 2011 May; 153(3):291-308. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08629.x. Review.

70. Lee SJ, Shover LR, Partridge AH, Patrizio P, Hammish Wallace W, Hagarty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K: American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. J Clin Oncol 2006, 24(18):1-15.

71. Leunens L, Celestin-Westreich S, Bonduelle M, et al. Follow-up of cognitive and motor development of 10-year-old singleton children born after ICSI compared with spontaneously conceived children. Hum Reprod, 2008; 23(1):105-111.

72. Levi Setti PE, Porcu E, Patrizio P, Vigiliano V, de Luca R, d'Aloja P, Spoletini R, Scaravelli G. Human oocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry data, 2007-2011. Fertil Steril. 2014;102(1): 90-95.e2.

73. Linee Guida "Preservazione della fertilità nei pazienti oncologici". AIOM, 2013

74. Linee Guida "Preservazione della fertilità nei pazienti oncologici". AIOM, 2015

75. Linee Guida ASCO (American Society of Clinical Oncology), 2013

76. Litton JK. Breast cancer and Fertility. Curr Treat Options Oncol, 2012; 13:137-145.

77. Longhi A., Porcu E., Petracchi S., Versari M., Conticini L., Bacci G. Reproductive functions in female patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for localized osteosarcoma of the extremity. Cancer, 2000; 89(9): 1961-65.

78. Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennano L, Magdalinski AJ, Patridge AH, Quinn G, Wallace WH and Kutluk Oktay. Fertility preservation for Patients with Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. Journal of Clinical Oncology. 2013;31(19): 2500-2510.

79. Mandl AM., The radiosensitivity of germ cells. Biol Rev, 1964; 39:288

80. Marchetti F, Bishop J, Gingerich J, Wyrobek AJ. Meiotic interstrand DNA damage escapes paternal repair and causes chromosomal aberrations in the zygote by maternal misrepair. Sci Rep. 2015 Jan 8; 5:7689. doi: 10.1038/srep07689.

81. Marcello MF, Nucifero G., Romeo R., Di Dino G., Russo I., Russo A., Palumbo G., Schliro' G.: Structural and ultrastructural study of the ovary in childhood leukemia after successful treatment. Cancer, 1990; 66: 2099-04.

82. Martinez Guillaume, Marie Walschaert, Marine Le Mitouard, Remi Borye, Claire Thomas, Jacques Auger, Isabelle Berthaut, Florence Brugnon. Impact of Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma and their treatments on sperm aneuploidy: a prospective study by the French CECOS network. Fertility and Sterility 2016 0015-0282.

83. Meirow D. Reproduction post chemotherapy in young cancer patients. Molecular and cellular Endocrinoloy, 2000; 169:123-31.

84. Meirow D, Ra'anani H, Shapira M, Brenghausen M, Derech Chaim S, Aviel-Ronen S, Amariglio N, Schiff E, Orvieto R, Dor J. Transplantations of frozen-thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria. Fertil Steril. 2016 Aug;106(2):467-74.

85. Michaan N, Ben-David G, Ben-Yosef D, Almog B, Many A, Pauzner D, et al. Ovarian stimulation and emergency in vitro fertilization for fertility preservation in cancer patients. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2010;149(2):17

86. Morice, P. et al. Recommendations of the Fertility Task Force of the European Society of Gynecologic Oncology about the conservative management of ovarian malignant tumors. Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc. 21, 951–963 (2011).

87. Mortimer D. Cryopreservation and assisted human conception. Reprod Biomed Online 9:134, 2004

88. Munster PN, Moore AP, Ismail-Khan R, et al. Randomized trial using gonadotropin-releasing hormone agonist triptorelin for the preservation of ovarian function during (neo)adjuvant chemotherapy for breast cancer. J Clin Oncol 2012, 30(5):533-538.

89. Nicosia SV., Matus-Ridley M., Meadows T. Gonadal effects of cancer therapy in girls. Cancer, 1985; 55:2364-72.

90. Noyes N, Porcu E, Borini A. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. Reprod Biomed Online, 2009; 18(6):769-76.

91. Noyes N, Labella PA, Grifo J, Knopman JM. Oocyte cryopreservation: a feasible fertility preservation option for reproductive age cancer survivors. J Assist Reprod Genet. 2010; 27: 495–9.

92. Oktay, K. & Karlikaya, G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. N. Engl. J. Med. 342, 1919 (2000).

93. Fertility Preservation Success Subsequent to Concurrent Aromatase Inhibitor Treatment and Ovarian Stimulation in Women With Breast Cancer. Oktay K., Turan V., Bedoschi G., Pacheco FS., and Moy F. J Clin Oncol. 33, 22: 2015

94. Olson CK, Keppler-Noreuil KM, Romitti PA, et al. In vitro fertilization is associated with an increase in major birth defects. Fertil Steril 2005, 84(5):1308-1315.

95. Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Spanò M, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Testicular cancer and sperm DNA damage: short- and long-term effects of antineoplastic treatment.

Andrology. 2015 Jan;3(1):122-8. doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00250.x. Epub 2014 Sep 2

96. Paradisi R. , Macciocca M., Vicenti R., Rossi S., Morselli-Labate AM, Mastroroberto M, Seracchioli R, Fabbri R. New insights in the selection and management of cancer patients applicants for ovarian tissue cryopreservation. Gynecol Endocrinol, Early Online: 1–5 2016.

97. Pereyra Pacheco B, Méndez Ribas JM, Milone G, et al. Use of GnRH analogs for functional protection of the ovary and preservation of fertility during cancer treatment in adolescents: A preliminary report. Gynecol Oncol 2001, 81:391-397.

98. Porcu E, Ciotti PM, Venturoli S. Handbook of human oocyte cryopreservation. Cambridge University Press 2013

99. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti MP, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injectoion of cryopreserved human oocytes. Fertility and Sterility 68; 4, 724-726, 1997.

100. Porcu E, Fabbri R, Petracchi S, Seracchioli R, Ciotti PM, Flamigni C. Ongoing pregnancy after ICSI of epididymal spermatozoa into cryopreserved human oocytes. Journal of Assisted Reproduction And Genetics, 16; 5, 283-285,1999.

101. Porcu E, Fabbri R, Petracchi S, Ciotti PM, Flamigni C. Ongoing pregnancy after intracytoplasmic injecton of testicular spermatozoa into cryopreserved human oocytes. American Journal of Obstetric and Gynecology, 180; 4, 1044-1045, 1999.

102. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, Venturoli S, Flamigni C. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. Molecular and Cellular Endocrinology. Nov; 169, 33, 2000

103. Porcu E. Oocyte freezing. Semin Reprod Med. Sep;19 (3), 221-230, 2001.

104. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Fratto R, Giunchi S, Venturoli S. Oocyte cryopreservation in oncological patients. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol., 2004;113 Suppl 1:S14-6

105. Porcu E, Venturoli S. Progress with oocyte cryopreservation. Curr Opin Obstet Gynecol. 2006 Jun;18(3):273-9.

106. Porcu E, Bazzocchi A, Notarangelo L, Paradisi R, Landolfo C, Venturoli S. Human oocyte cryopreservation in infertility and oncology. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes., 2008;15(6):529-35.

107. Porcu E, Venturoli S, Damiano G, Ciotti PM, Notarangelo L, Paradisi R, Moscarini M, Ambrosini G. Healthy twins delivered after oocyte cryopreservation and bilateral ovariectomy for ovarian cancer. Reprod Biomed Online, 2008a; 17(2):265-7.

108. Porcu E, Cipriani L, Damiano G, Bazzocchi A, Bianchi A, Albonetti F, Fabbri F, Dall'O' F, Orsili I, Maestri S, Notarangelo L, Rossi S, Orazi L, Venturoli S. Oocyte cryopreservation after ovarian stimulation with gonadotropin and Letrozole to save fertility in breast cancer. 30° Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Munich, Germany – June 29 to 2 July 2014; Abstract. P-287

109. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine; Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocytes cryopreservation: a guideline. Fertil Steril, 2013; 99: 37-43.

110. Recchia F, Saggio G, Amiconi G, et al. Gonadotropin-releasing hormone analogues added to adjuvant chemotherapy protect ovarian function and improbe clinical outcomes in young women with early breast carcinoma. Cancer 2006, 106:514-523.

111. Revelli, A. et al. Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy. Fertil. Steril. 99, 227–230 (2013).

112. Revelli A, Porcu E, Levi Setti PE, Delle Piane L, Merlo DF, Anserini P. Is letrozole needed for controlled ovarian stimulation in patients with estrogen receptor-positive breast cancer? Gynecol Endocrinol. 2013 Nov;29(11):993-6. doi: 10.3109/09513590.2013.819083. Epub 2013 Sep 3.

113. Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, Colamaria S, Sapienza F, Ubaldi F. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. Hum Reprod. 2010; 25(1): 66-73.

114. 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

115. Sherman JF. Cryopreservation of Human Semen. In Keel BA, Webster BW (Eds). Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. CRC Press, Boca Raton, 1990, p. 229.

116. Stern, C. J., Toledo, M. G., Hale, L. G., Gook, D. A. & Edgar, D. H. The first Australian experience of heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue: evidence of establishment of normal ovarian function. Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol. 51, 268–275 (2011).

117. Stern, C. J. et al. First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a woman after a bilateral oophorectomy. Hum. Reprod. Oxf. Engl. 28, 2996–2999 (2013).

118. Sverrisdottir A, Nystedt M, Johansson H, Fornander T. Adjuvant goserelin and ovarian preservation in chemotherapy treated patients with early breast cancer: results from a randomized trial. Breast Cancer Res Treat 2009; 117: 561e7.

119. Telfer, E. E. & Zelinski, M. B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. Fertil. Steril. 99, 1523–1533 (2013).

120. Turan V, Bedoschi G, Moy F and Oktay K. Safety and feasibility of performing two consecutive ovarian stimulation cycles with the use of letrozole-gonadotropin protocol for fertility preservation in breast cancer patients. Fertil and Steril. 2013; 100, (6).

121. Yang D et al. Live birth after the transfer of human embryos developed from cryopreserved oocytes harvested before cancer treatment. Fertil Steril, 2007;87(6):1469.e1-4

122. Wallace HB,a Thomas W. Kelsey, Ph.D.,b and Richard A. Anderson. Fertility preservation in pre-pubertal girls with cancer: the role of ovarian tissue cryopreservation. Fertility and Sterility® Vol. 105, No. 1, January 2016 0015-0282.

123. Waxman, J. H. et al. Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. Cancer Chemother. Pharmacol. 19, 159–162 (1987).

124. 100. Wennerholm UB et al. Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. Hum Reproduc 2009; 24: 2158-2172.

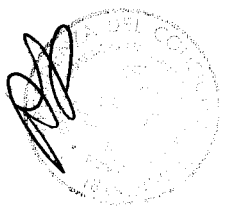
125. 101. Winther, J. F. et al. Genetic disease in the children of Danish survivors of childhood and adolescent cancer. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 30, 27–33 (2012).

126. Wyrobek, A. J., Schmid, T. E. & Marchetti, F. Relative susceptibilities of male germ cells to genetic defects induced by cancer chemotherapies. J. Natl. Cancer Inst. Monogr. 31–35 (2005).

127. Zhang Lu, Li-Ying Yan, Xu Zhi, Jie Yan, Jie Qiao. Female Fertility: Is it Safe to "Freeze?" Chinese Medical Journal ¦ February 5, 2015 ¦ Volume 128 ¦ Issue 3.



PERCORSO DIAGNOSTICO TERAPEUTICO E ASSISTENZIALE (PDTA) PER PAZIENTI ONCOLOGICI CHE DESIDERINO PRESERVARE LA FERTILITÀ



SINOSSI DEL PERCORSO DI TUTELA DELLA FERTILITA' NEI PAZIENTI ONCOLOGICI

1. Constatazione dell'aumento recente progressivo del tasso di sopravvivenza al cancro
2. Conseguente apertura di una prospettiva di fertilità nei/nelle pazienti sopravvissuti al cancro
3. Necessità di protezione della fertilità dal cancro
4. Identificazione dell'esigenza di fertilità dei pazienti da parte dei centri oncologici ed ematologici
5. Invio all'Unità organizzativa di Medicina e Chirurgia della Fertilità di riferimento regionale e valutazione della eventuale opportuna strategia di protezione-preservazione della fertilità a seconda della diagnosi neoplastica e delle condizioni anatomico e funzionale delle gonadi
6. Le strategie di protezione-preservazione della fertilità annoverano:
    a) Chirurgia conservativa (es tumore borderline ovaio)
    b) Trasposizione ovarica (es in caso di Irradiazione)
    c) Trattamento medico con analoghi del GnRH (riduzione dell'insulto chemioterapico alle gonadi)
    d) Crioconservazione dei gameti maschili (tecnica semplice e poco invasiva sia come raccolta dei gameti sia come procedura di crioconservazione)
    e) Crioconservazione dei gameti femminili (tecnica relativamente semplice preceduta da superovulazione con gonadotropine-analoghi del GnRH ed eventualmente letrozolo da valutare caso per caso)
    f) Crioconservazione del tessuto gonadico maschile (tecnica relativamente complessa in caso di non disponibilità di gameti eiaculati)
    g) Crioconservazione del tessuto gonadico femminile (tecnica complessa, ancora sperimentale da scegliere in caso di mancanza di tempo per la superovulazione o di soggetti prepuberi nei quali sia effettivamente indicata considerando il bilancio costi/benefici)
7. Il Centro organizzativo di Medicina e Chirurgia della Fertilità di riferimento Regionale, a seconda della propria organizzazione, e del bacino di utenza, e della tecnica di protezione-preservazione della fertilità, può scegliere di eseguire al proprio interno la strategia prescelta o di indirizzare l'esecuzione materiale ad un Centro Satellite di Preservazione della Fertilità (Banca) autorizzato per questi fini. La Banca dovrà avere i requisiti stabiliti al cap. 8 del documento "Tutela della fertilità nei pazienti oncologici" e, in particolare, quelli previsti al punto 8.1.2.
8. È ipotizzabile che il numero di Unità di Medicina e Chirurgia della Fertilità sia di 1 ogni circa 5 milioni di abitanti e, pertanto, circa 10 nel territorio nazionale dislocati per Regioni o aggregazioni di Regioni.

9. L'Unità di Medicina e Chirurgia della Fertilità identificata dalla Regione/aggregazioni di Regioni sarà il punto di riferimento per i Centri Oncologici ed ematologici, ed in particolare per l'utenza, mettendo a disposizione un numero telefonico dedicato con personale esperto nel valutare le richieste e con presa in carico dei pazienti entro 48-72 ore

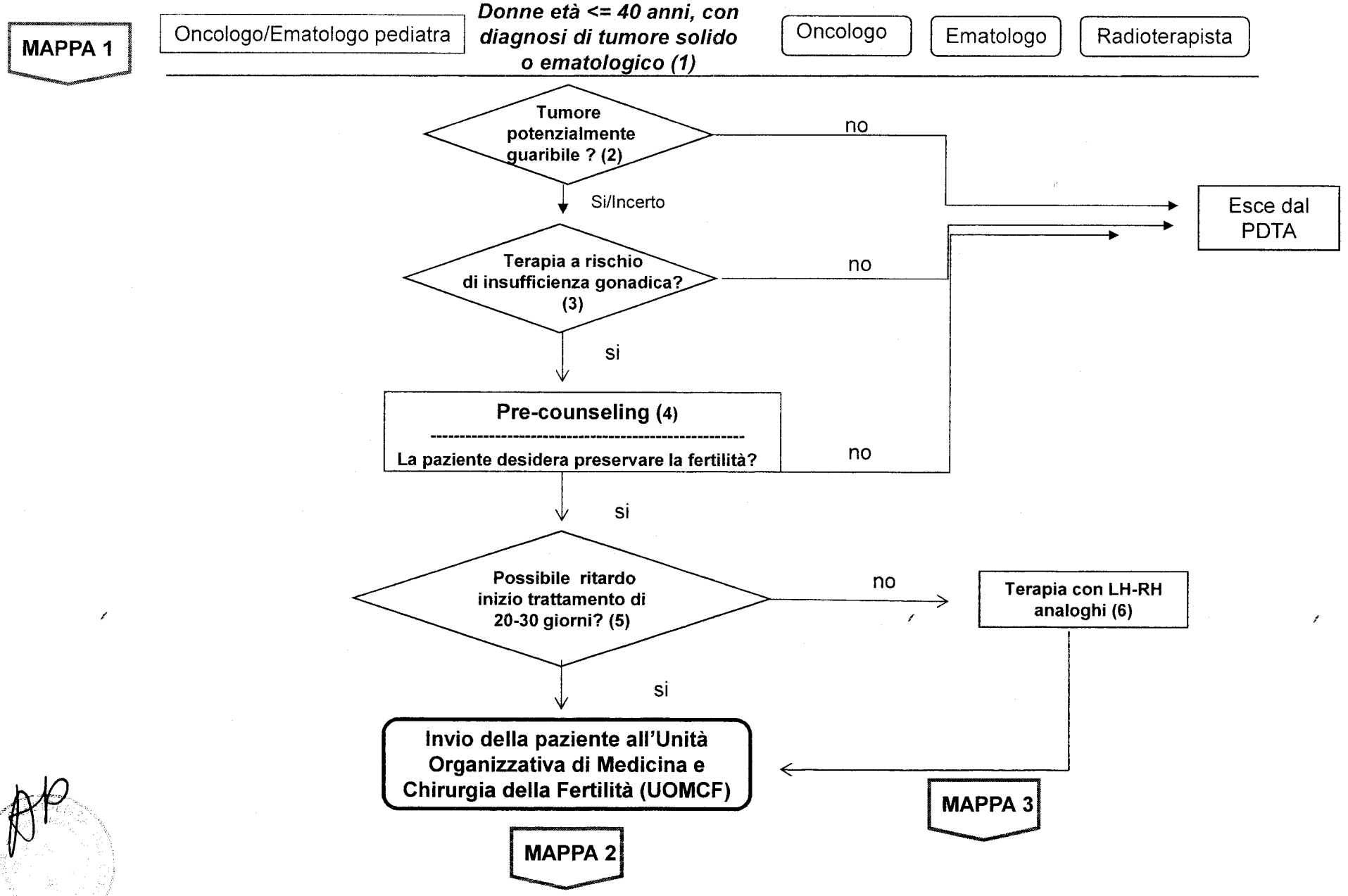
10. L'Unità Organizzativa di Medicina e Chirurgia della Fertilità si farà carico del follow up post interventi dei pazienti con verifica periodica della riserva gonadica e disponibilità all'eventuale ripristino della fertilità se necessario con procedure chirurgiche (es reimpianto tessuto gonadico) o di procreazione medicalmente assistita con gameti crioconservati o freschi (a seconda della riserva funzionale residua)

11. L'Unità Organizzativa di Medicina e Chirurgia della Fertilità resterà costantemente in contatto e a disposizione del Centro Oncologico ed ematologico di Riferimento per ogni eventuale variazione della prognosi neoplastica.

12. Attività formativa. Verrà organizzata un' attività formativa sulla Fertilità per Oncologi e Medici di Medicina Generale come da Piano Nazionale della Fertilità del Ministero della Salute

13. Indicatori di Qualità. Verranno stabiliti indicatori di qualità che valutino i tempi di risposta delle strutture, il numero di trattamenti, i risultati ottenuti incluse le gravidanze ed i follow up dei bambini nati ecc




MAPPA 1
Oncologo/Ematologo pediatra
Donne età <= 40 anni, con diagnosi di tumore solido o ematologico (1)
Oncologo
Ematologo
Radioterapista
Tumore potenzialmente guaribile ? (2)
no
Si/Incerto
Esce dal PDTA
Terapia a rischio di insufficienza gonadica? (3)
no
si
Pre-counseling (4)
La paziente desidera preservare la fertilità?
no
si
Possibile ritardo inizio trattamento di 20-30 giorni? (5)
no
Terapia con LH-RH analoghi (6)
si
Invio della paziente all'Unità Organizzativa di Medicina e Chirurgia della Fertilità (UOMCF)
MAPPA 3
MAPPA 2

NOTE ALLA MAPPA 1
PAZIENTE CON DIAGNOSI DI TUMORE, CHE NECESSITA DI TRATTAMENTI POTENZIALMENTE GONADOTOSSICI, IN ETA' FERTILE (<= a 40 anni).

Nota 1. questo PDTA è indirizzato a persone dalla pubertà ai 40 anni. Per eventuali soggetti in età prepubere, la raccolta di tessuto ovarico in laparoscopia, sarà di volta in volta valutato insieme ai genitori del minore.

Nota 2. E' a carico dello specialista che ha in cura la paziente, valutare la prognosi del tumore.

Nota 3. E' a carico dello specialista che ha in cura la paziente, una volta stabilito il tipo di trattamento oncologico, definire il grado di potenziale tossicità gonadica e attivare il percorso per garantirne la preservazione della fertilità. E' prevista una specifica formazione per garantire a tutti i pazienti oncologici l'applicazione del PDTA, ove indicato.

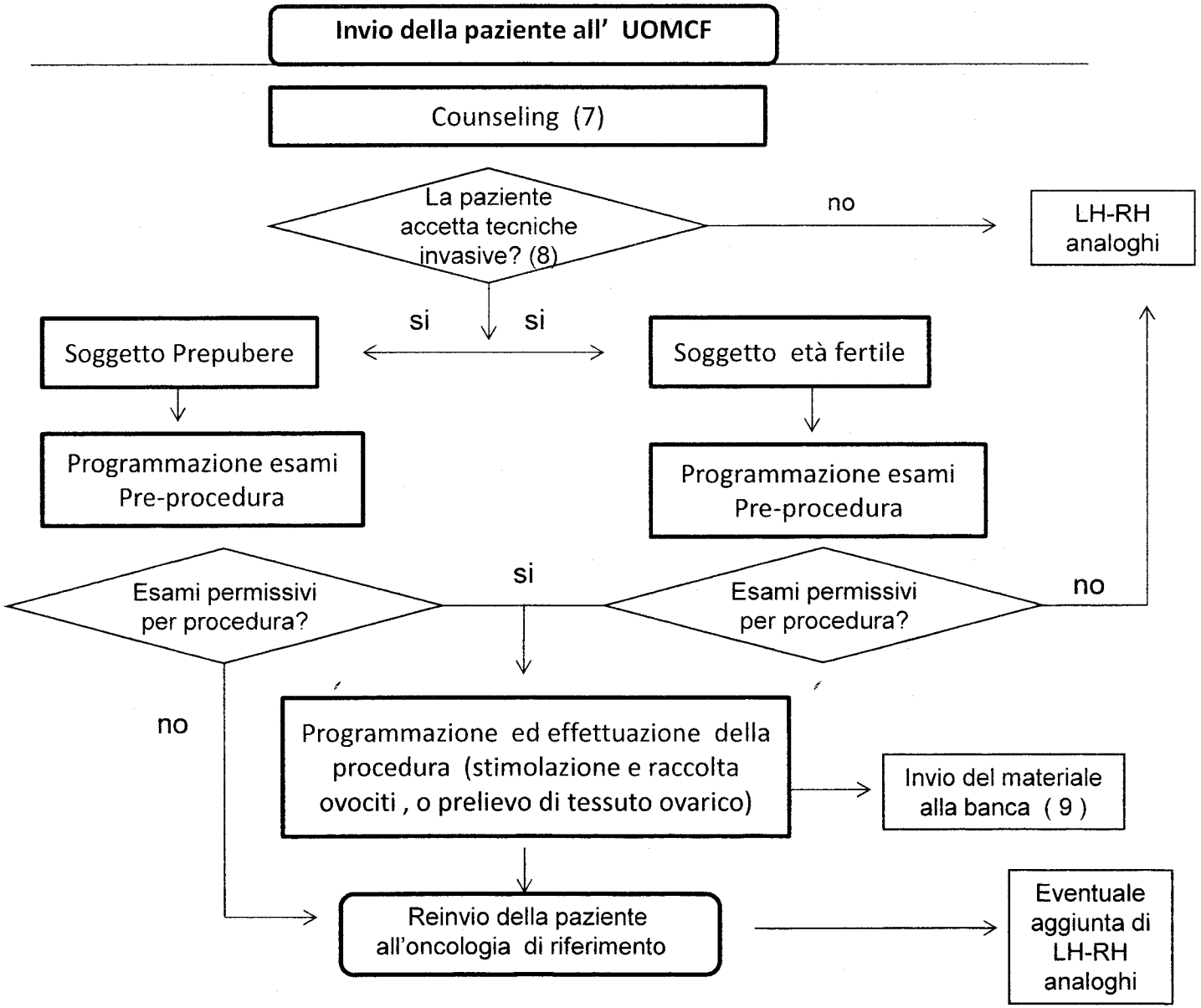
Nota 4. Questo pre-counseling va effettuato presso il centro di oncologia che ha in cura la paziente. E' consigliabile che l'oncologo (o al pediatra oncologo, o al radioterapista, o al chirurgo-in base al tipo di tumore), sia coadiuvato dallo psicologo. Il pre-counseling permette di identificare se la paziente è desiderose di sottoporsi a procedure invasive, evitando l'invio all'Unità Organizzativa di Medicina e Chirurgia della fertilità (UOMCF) di pazienti non interessate. L'obiettivo è quello di garantire a tutte le potenziali pazienti di mantenere la fertilità. L'invio all'UOMCF deve garantire una rapida presa in carico. Ogni centro di oncologia dovrà pertanto dotarsi di una procedura scritta, condivisa con l'UOMCF nella quale vanno definiti, tempi e modalità della presa in carico, sia per femmine che per maschi.

Nota 5. Devono essere garantiti i tempi massimi di effettuazione della presa in carico e delle procedure, con appuntamento entro massimo 72 ore. Viene proposto un tempo massimo di 30 giorni dalla segnalazione del/della paziente all'UOMCF, al reinvio in oncologia, per inizio trattamento antitumorale.

Nota 6. Se la paziente non desidera effettuare procedure invasive di preservazione della fertilità, verrà proposto un trattamento con LH-RH analoghi.

PAZIENTE CON TUMORE DESIDEROSA DI PRESERVARE LA FERTILITA'

MAPPA 2



NOTE ALLA MAPPA 2.
PAZIENTE CON TUMORE DESIDEROSA DI PRESERVARE LA FERTILITA'. INVIO DELLA PAZIENTE ALL'UOMCF.

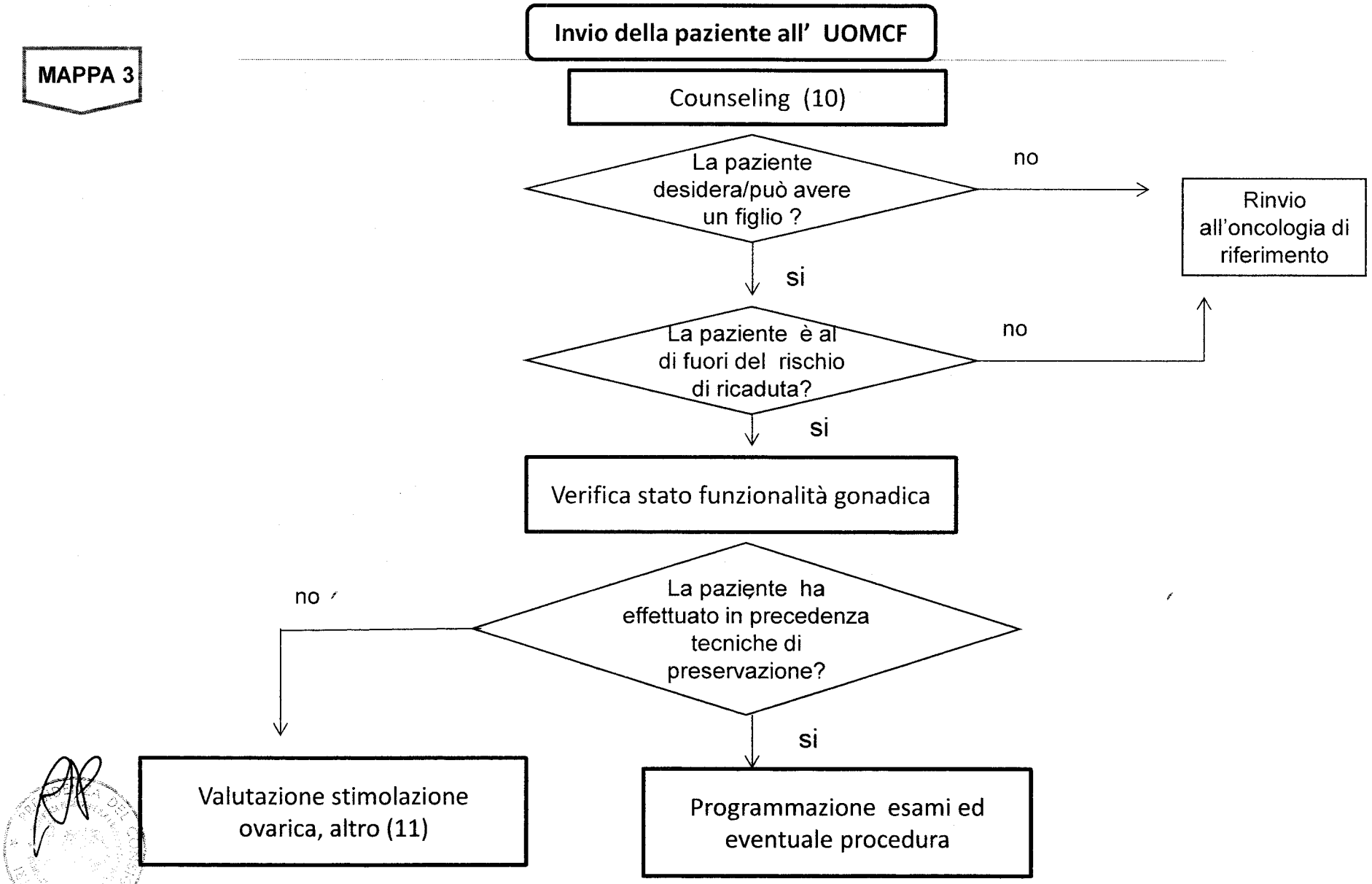
Nota 7. Il counseling sarà effettuato presso l'UOMCF, dove è presente un team multidisciplinare dedicato; in quell'occasione sarà valutata l'idoneità del soggetto per le varie tecniche di preservazione della fertilità.

Nota 8. Nel colloquio il medico dell'UOMCF proporrà alla paziente le diverse opzioni.

Nota 9. L'UOMCF deve garantire in proprio, o tramite accordo scritto con Biobanca del SSN o struttura accreditata, la conservazione del materiale in conformità alle direttive vigenti .

PAZIENTE IN ETA' FERTILE SOTTOPOSTA A TRATTAMENTI ANTITUMORALI GONADOTOSSICI

MAPPA 3



NOTE ALLA MAPPA 3
PAZIENTE IN ETA' FERTILE SOTTOPOSTA A TRATTAMENTI ANTITUMORALI GONADOTOSSICI. INVIO DELLA PAZIENTE ALL'UOMCF

10. E' compito dell'oncologo, valutare in relazione al tempo intercorso dalla diagnosi e al rischio di recidiva, e al desidera della paziente, di inviare la paziente all'UOMCF.

11- Per pazienti con tumori endocrino sensibili (in particolare carcinoma della mammella), i dati di sicurezza della procedura di stimolazione ovarica senza successiva chemioterapia sono ad oggi molto limitati (Goldrat et al EJC 2015). E' necessario che questo aspetto venga comunicato e condiviso con la paziente.

MAPPA 4

Andrologo/Oncologo/Ematologo
Pediatra

Uomini con diagnosi di tumore solido o ematologico

Oncologo | Ematologo | Radioterapista

