

Crioconservazione e preservazione della fertilità femminile. Aspetti clinici ed organizzativi.

**E. Vizza, E. Mancini, G. Corrado, E. Baiocco
Istituto Nazionale Tumori- Regina Elena - Roma**

Le nuove strategie terapeutiche antitumorali hanno portato negli ultimi anni ad un progressivo aumento della sopravvivenza media delle giovani donne affette da neoplasie, ponendo l'attenzione sugli effetti a lungo termine delle terapie oncosoppressive e sulla qualità di vita delle pazienti dopo trattamento (1).

Gli agenti alchilanti (carboplatino, cisplatino, ciclofosfamide, dacarbazina), insieme alla radioterapia esitano in una elevata percentuale dei casi nell'insufficienza ovarica (2).

L'entità del danno al potenziale riproduttivo è variabile e dipende dall'età della paziente, dal tipo di trattamento, dalla dose cumulativa somministrata e dalla dimensione iniziale della riserva follicolare ovarica.

L'amenorrea si verifica in una percentuale compresa tra il 20 e il 70% dei casi per donne con età inferiore a 40 anni e nel 50-100% dei casi per donne con età maggiore. L'amenorrea permanente è correlata all'età al momento del trattamento e compare, in genere, durante la chemioterapia o dopo un periodo variabile di oligoamenorrea. La dose mediana di ciclofosfamide che può indurre amenorrea in una donna di 40 anni è di 5,2 g, diventa di 9,3g e maggiore di 20 g rispettivamente nelle donne di circa 30 anni o più giovani.

Anche la radioterapia ha un effetto dannoso sulla funzione ovarica strettamente in rapporto con la dose, il campo di applicazione e l'età della paziente. Una dose totale superiore a 800 rads è sufficiente a causare una sterilità secondaria permanente da esaurimento ovarico (2).

Le attuali strategie proposte per preservare la fertilità nella donna sono rappresentate da: crioconservazione degli embrioni, congelamento degli ovociti, trasposizione ovarica, protezione ovarica mediante farmaci analoghi del GnRH e farmaci inibitori dell'apoptosi, crioconservazione del tessuto ovarico.

La crioconservazione embrionaria è una tecnica collaudata e sicura. Nelle pazienti oncologiche la crioconservazione embrionaria sarebbe una strategia di estrema utilità per la sicurezza della tecnica e l'accettabilità del tasso di gravidanza, ma in realtà bisogna considerare l'età delle pazienti, la necessità di un partner stabile ed i lunghi tempi di esecuzione poiché nella maggior parte dei casi le pazienti pervengono con la necessità di iniziare subito i trattamenti oncologici.

La crioconservazione del tessuto ovarico ed il successivo reimpianto dopo remissione completa della malattia ha suscitato grande interesse in letteratura.

La corticale ovarica contiene un gran numero di follicoli primordiali quiescenti che rappresentano una riserva delle cellule germinali femminili. Il congelamento di frammenti di corticale ovarica consente di preservare sia la funzione steroidogenetica che la funzione riproduttiva.

I possibili impieghi clinici del tessuto ovarico congelato-scongelato sono rappresentati dal trapianto ovarico e dalla maturazione in vitro (IVM) di follicoli primordiali, per ottenere ovociti maturi e competenti per la fecondazione.

Nel 2004 il gruppo belga di Donnez ha ottenuto la prima gravidanza spontanea dopo crioconservazione di frammenti ovarici ed il loro reimpianto in sede pelvica ortotopica in giovane donna affetta da linfoma di Hodgkin al IV Stadio (3). L'anno successivo Meirow et al. hanno descritto invece la prima gravidanza a termine dopo fecondazione in vitro in una paziente affetta da linfoma non-Hodgkin dopo reimpianto ortotopico, sull'ovaio residuo, di tessuto ovarico crioconservato prima della chemioterapia (4). Attualmente il numero di nati vivi dopo di reimpianto di tessuto ovarico è di 18 (5,6,7,8).

Nonostante i risultati incoraggianti esistono tuttavia dei rischi per l'applicazione clinica della metodica: bisogna considerare il rischio di reimpianto di cellule neoplastiche eventualmente presenti nel tessuto ovarico congelato, sebbene la crescente sensibilità delle tecniche di biologia molecolare consente di identificare con elevata accuratezza la presenza di cellule tumorali nel frammento ovarico da reimpiantare. Un ulteriore ostacolo all'applicazione clinica del trapianto della corticale ovarica è la breve durata della funzione follicologenetica, dovuta principalmente ad un danno strutturale dei follicoli conseguente al congelamento. Infatti, benché la neoangiogenesi abbia un ruolo chiave nel ripristinare la vascolarizzazione del tessuto trapiantato è noto che il danno ischemico dei follicoli è più pronunciato nel tessuto congelato che in quello fresco. La corticale ovarica è una struttura complessa che comprende diversi istotipi cellulari; una corretta tecnica di congelamento deve essere in grado di preservare l'integrità di cellule di diverse dimensioni, quali le cellule tecali, cellule della granulosa, ovociti, cellule dello stroma, ma anche le interazioni cellulo-cellulari necessarie alla ripresa dell'attività del follicolo. Inoltre è importante non solo preservare l'integrità morfologica del follicolo e del circostante tessuto stromale, ma anche evitare di alterare le caratteristiche funzionali delle strutture coinvolte nei delicati meccanismi che sottendono alla transizione da follicolo immaturo a follicolo in crescita. Evidenze sempre più importanti in campo scientifico dimostrano che la vitrificazione rappresenta un protocollo più idoneo al congelamento di strutture cellulari complesse.

La vitrificazione è un processo che, trasforma l'acqua dallo stato liquido ad uno stato amorfo, similvetroso, attraverso una brusca variazione di temperatura, impedendo la formazione di cristalli di ghiaccio. Per la realizzazione di questo processo è necessaria una drastica riduzione della temperatura che si ottiene immergendo direttamente il tessuto ovarico in azoto liquido.

Anche lo scongelamento avviene rapidamente, estraendo direttamente il tessuto dall'azoto liquido (9).

Presso la U.O.C. di Ginecologia Oncologica dell'Istituto Nazionale Tumori- Regina Elena-Roma è in corso di realizzazione un protocollo sperimentale di crioconservazione del tessuto ovarico, attraverso l'attuazione di una banca del tessuto ovarico per le pazienti oncologiche in procinto di iniziare terapie oncosoppressive. Il progetto sarà rivolto a tutte le donne con età non superiore ai 35 anni affette da patologie neoplastiche che si rivolgono al nostro centro per preservare la fertilità prima di un trattamento oncologico. Saranno candidate al trapianto di tessuto ovarico tutte le pazienti affette da neoplasie del sistema ematopoietico (LMC, LMA, LLA, linfoma di Hodgkin e non-Hodgkin), neoplasia della mammella, tumore di Wilms, sarcoma di Ewing, osteosarcoma, carcinoma cervicale ed endometriale agli stadi iniziali sottoposte a trattamento conservativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Ries LAG et al. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United State SEER program 1975-1995. Bethesda, MD: National cancer Institute, 1999; 1-15.
2. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian Tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil. Steril.* 2004;82: 993-8.
3. Donnez J. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004; 364:1405-10.
4. Meirow D. et al. Ovarian tissue banking in patients with Hodgkin's disease. Is it safe? *Fertil. Steril.* 1998;69:996-8.

5. Donnez J. et al. Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue, a review of 13 live births. *Ann Med.* 2011;43(6):437-50.
6. Donnez J. et al. Preservation of fertility in females with haematological malignancy. *Br J Haematol.* 2011 Jul;154(2):175-84.
7. Müller A. et al. Retransplantation of cryopreserved ovarian tissue: the first live birth in Germany. *Dtsch Arztebl Int.* 2012 Jan;109(1-2):8-13.
8. García Rada A. Spanish woman becomes pregnant through ovarian tissue transplantation. *BMJ.* 2012 Jan 5;344.
9. Isachenko V. et al. Cryobanking of human ovarian tissue for anticancer treatment: comparison of vitrification and conventional freezing. *Cryo Letters* 2009 nov-dec; 30 (6) :449-54