

Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Scienze Ginecologiche e della Riproduzione Umana  
Scuola di Specializzazione in Ginecologia e Ostetricia  
Direttore Prof. Giovanni Battista Nardelli



# ***Preservazione della fertilità in paziente affetta da carcinoma mammario***

- ***Dott.ssa Roberta Elisa SOLDA'***





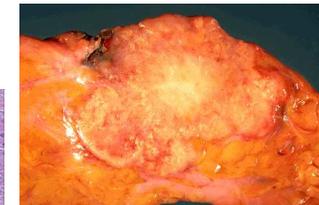
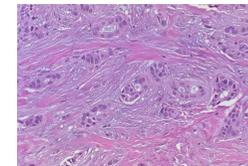
## ***Caso Clinico***

- C. E., 29 anni
- Ca mammario di recente diagnosi, inviata presso il nostro Centro dall'U.O.C. di Oncologia Medica

“per lo stadio di malattia, l'età e le caratteristiche biologiche si illustrano possibilità di preservazione della fertilità”

- 4.03.2014: mastectomia dx e dissezione ascellare

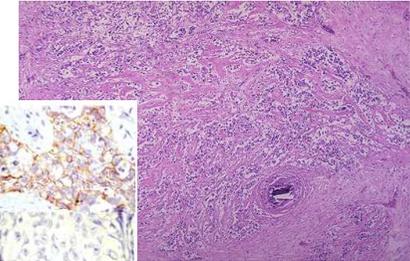
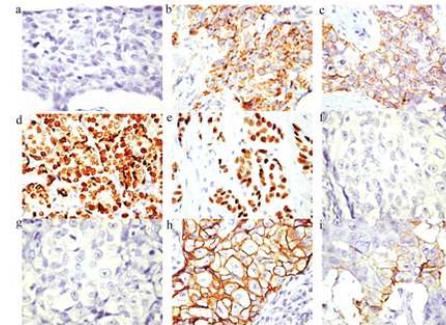
Carcinoma duttale infiltrante G3 sec. Elston Ellis, con componente intraduttale focale con comedonecrosi, infiltrato linfocitario intra e peritumorale scarso; necrosi assente. Evidente l'invasione perineurale e angiolinfatica. Restante parenchima con mastopatia fibroadenomatosa. Indenne il capezzolo, i margini di resezione e la cute



**Carcinoma duttale infiltrante  
G3 pT1c**



- Micrometastasi in 2 linfonodi
- Fenotipo: ➤ ER 95%
  - PgR 50%
  - Ki67 20%
  - Her-2/neu: score 2+
  - CISH: non amplificato



- Rx torace: negativo per secondarismi
- Ecografia addome completo: non evidenziabili anomalie a carico degli organi valutati
- Scintigrafia ossea TB: negativa



Chemioterapia adiuvante  
sec. Schema FEC-D (6  
cicli/21 gg)



Ormonoterapia con  
Tamoxifene e LH-RH



- 4.04.2014: Prima consulenza presso il nostro Centro  
Raccolta l'anamnesi, visionata la documentazione, eseguito counselling adeguato sul possibile impatto del trattamento chemioterapico a livello gonadico, spiegate le tecniche di PMA, raccolto il consenso informato
- Valutazione della Riserva ovarica tramite dosaggio biochimico ed ecografia pelvica transvaginale

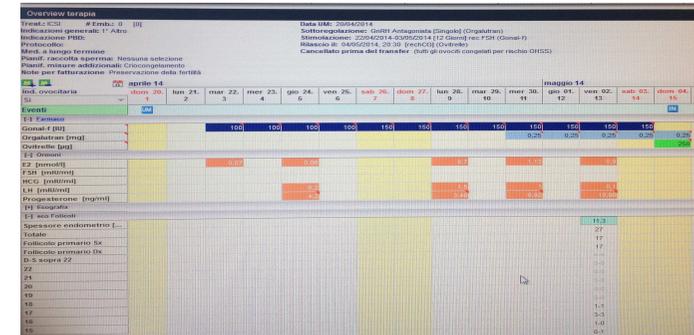
FSH J2: 4,2 U/L  
LH J2: 2,8 U/L  
E2: 0,27 nmol/L  
AMH: 5,0 ug/L

Utero AVF, regolare, EE 1,6 mm  
Ovaio dx: 10 AFC  
Ovaio sx: 6 AFC  
Non free-fluid nel Douglas





- 20.04.2014: inizio mestruazioni
- 22.04.2014: inizio stimolazione ormonale



Ciclo corto con **antagonista del GnRH (schema fisso)**

e

**r-hFSH** (100 UI/die per i primi 4 giorni, poi aumentati a 150 UI/die)

Induzione dell'ovulazione con **250 µg di r-hCG**

Utilizzo di **Letrozolo cpr 5 mg/die** durante l'intera durata della stimolazione



- 4.05.2014: induzione dell'ovulazione ( **J13 di stimolazione ormonale, valori di E2: 0,9 nmol/L, follicoli  $\geq 16\text{mm}$ : 8** )
- 6.05.2014: prelievo ovocitario ecoguidato

Recuperati **19** ovociti:

17 in MII      1 in MI      1 VG



Gli ovociti sono stati tutti crioconservati con metodo *slow-freezing*

Trattamento	Giorno 0 06/05/2014	Giorno 1 07/05/2014	Giorno 2 08/05/2014	Giorno 3 09/05/2014	Giorno 4 10/05/2014	Giorno 5 11/05/2014	SP
1	☼	☼	○	○	○	○	
2665							
2	☼	☼	○	○	○	○	
2666							
3	☼	☼	○	○	○	○	
2667							
4	☼	☼	○	○	○	○	
2668							
5	☼	☼	○	○	○	○	
2669							
6	☼	☼	○	○	○	○	
2670							
7	☼	☼	○	○	○	○	
2671							
8	☼	☼	○	○	○	○	
2672							
9	☼	☼	○	○	○	○	
2673							
10	☼	☼	○	○	○	○	
2674							
11	☼	☼	○	○	○	○	
2675							
12	☼	☼	○	○	○	○	
2676							
13	☼	☼	○	○	○	○	
2677							
14	☼	☼	○	○	○	○	
2678							
15	☼	☼	○	○	○	○	
2679							
16	☼	☼	○	○	○	○	
2680							
17	☼	☼	○	○	○	○	
2681							
18	☼	☼	○	○	○	○	
2682							
19	☼	☼	○	○	○	○	
2683							



## Carcinoma Mammario



- + 1,5 % di nuovi casi di neoplasie nella popolazione femminile nelle ultime due decenni

International Agency for Research on Cancer. EUCAN. Cancer Factsheets. 2013

- Rischio di sviluppare un ca. mammario è di 1/8

- 2/3 sarà sottoposta a un trattamento neoadiuvante

Kim et al., Breast cancer and fertility preservation, Fert and Ster, 2011

- Tassi di sopravvivenza a 5y 60-82%

De Angelis R et al. Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EURO CARE-5-a population-based study. Lancet Oncol 2014;15(1):23–34.

- Importanza di salvaguardare la QoL , tra cui la capacità riproduttiva

Table 1 Ten leading cancer types for the estimated new cancer cases and deaths by sex, United States, 2014

Estimated new cases*		Males Females		Estimated deaths	
Prostate	233,000 27%			Breast	232,670 29%
Lung and bronchus	116,000 14%			Lung and bronchus	108,210 13%
Colorectum	71,830 8%			Colorectum	65,000 8%
Urinary bladder	56,390 7%			Uterine corpus	52,630 6%
Melanoma of the skin	43,890 5%			Thyroid	47,790 6%
Kidney and renal pelvis	39,140 5%			Non-Hodgkin lymphoma	32,530 4%
Non-Hodgkin lymphoma	38,270 4%			Melanoma of the skin	32,210 4%
Oral cavity and pharynx	30,220 4%			Kidney and renal pelvis	24,780 3%
Leukemia	30,100 4%			Pancreas	22,890 3%
Liver and intrahepatic bile duct	24,600 3%			Leukemia	22,280 3%
All sites	855,220 100%			All sites	810,320 100%





## Impact of cancer therapies on ovarian reserve

Clarisa R. Gracia, M.D., M.S.C.E.,<sup>a,b</sup> Mary D. Sammel, Sc.D.,<sup>c</sup> Ellen Freeman, Ph.D.,<sup>a,d</sup> Maureen Prewitt, R.N.,<sup>a,e</sup> Claire Carlson, R.N.,<sup>f</sup> Anushree Rav.,<sup>g</sup> Ashley Vance,<sup>g</sup> and Jill P. Ginsberg, M.D.<sup>h</sup>

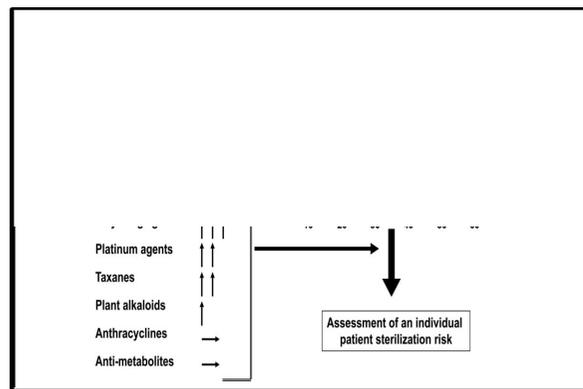
- Incidenza di amenorrea correlata alla chemioterapia **53-89 %**
- Dipende da :
  - Età della paziente
  - Regime chemioterapico

Management of Gynecologic Issues in Women with Breast Cancer. ACOG, Practice Bulletin

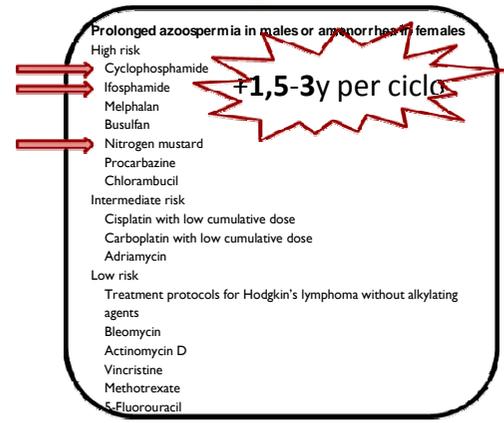


### Valutare AMH !\*

\*[AMH e AFC ridotti in maniera dose-dipendente nonostante cicli spontanei regolari e FSH in range. Gracia et al, *Fertility and Sterility* 2012 ]



Biological targeted therapies ?



61% <40y  
95% >45y  
MAYO CLINIC

- Apoptosi delle cellule della granulosa con atresia dei follicoli antrali
- ↓ del pool di follicoli primordiali
- Danno ischemico
- Fibrosi della corticale

**ATROFIA OVARICA**

Metodo contraccettivo DURANTE la terapia e fino a DUE ANNI dal completamento della stessa

This underscores further the importance of giving the ovaries some time to recover after chemotherapy.



## The radiosensitivity of the human oocyte

W.H.B.Wallace<sup>1,3</sup>, A.B.Thomson<sup>1</sup> and T.W.Kelsey<sup>2</sup>

- Pazienti affette da linfoma di Hodgkin, sarcoma di Ewing, neoplasie ginecologiche
- Correlato a :
  - Dose totale
  - Regime di frazionamento
  - Campo di irradiazione
  - Età della paziente
- Schermatura delle gonadi dove possibile (in TBI per BMT 90% di POF)
- LD<sub>50</sub> follicolare: 2Gy
- Stenosi vaginale, fibrosi uterina, diminuzione spessore EE

Prolonged azoospermia in males or amenorrhea in females	
High risk	
→	Total body irradiation for bone marrow transplant/stem cell transplant
	Testicular radiation dose >2.5 Gy in adult men
	Testicular radiation dose $\geq 6$ Gy in prepubertal boys
→	Pelvic or whole abdominal radiation dose $\geq 6$ Gy in adult women
→	Pelvic or whole abdominal radiation dose $\geq 10$ Gy in postpubertal girls
→	Pelvic or whole abdominal radiation dose $\geq 15$ Gy in prepubertal girls
Intermediate risk	
	Testicular radiation dose 1–6 Gy from scattered pelvic or abdominal radiation
	Pelvic or whole abdominal radiation dose 5–10 Gy in postpubertal girls
	Pelvic or whole abdominal radiation dose 10–15 Gy in prepubertal girls
	Craniospinal radiotherapy dose $\geq 25$ Gy



RT a livello cranico per neoplasie encefaliche con danneggiamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e alterazioni della secrezione delle gonadotropine

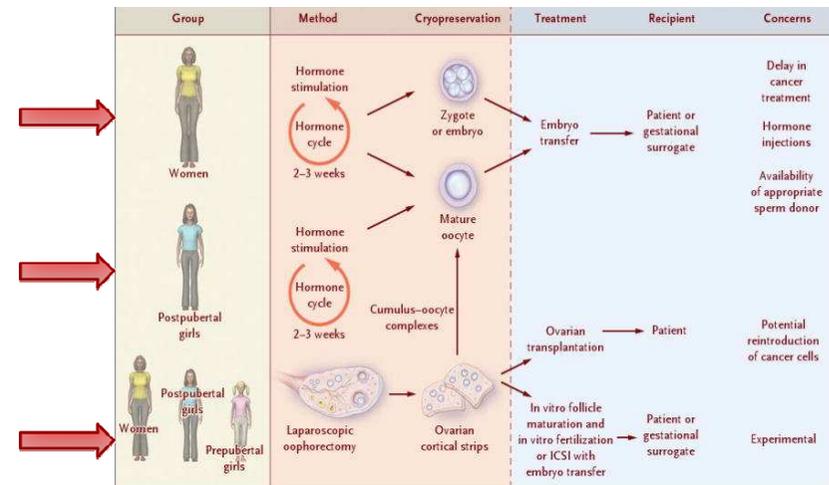
## Preservazione della fertilità

“ Tecniche atte a preservare la fertilità in pazienti oncologiche con il fine di preservare i propri gameti per futuri tentativi di concepimento ”

Le opzioni di trattamento dipendono da molti fattori: età della paziente, diagnosi, terapia proposta, tempo disponibile, potenziale coinvolgimento metastatico a livello ovarico, tecniche disponibili

Lee et al., Determinants to access to fertility preservation in women with breast cancer, Fert and Ster, 2011

- Schermatura gonadica
- Trasposizione ovarica (ooforopessi)
- Uso dei GnRHa
- Crioconservazione di **embrioni**  
Non legale in Italia, Legge 40/2004, Art.12 Comma 4
- Crioconservazione di **ovociti**
- Crioconservazione di **tessuto ovarico**  
Tecnica ancora sperimentale
- Fecondazione eterologa



Jeruss et al., Preservation of fertility in patients with cancer, N Engl J Med, 2009



## Crioconservazione ovocitaria

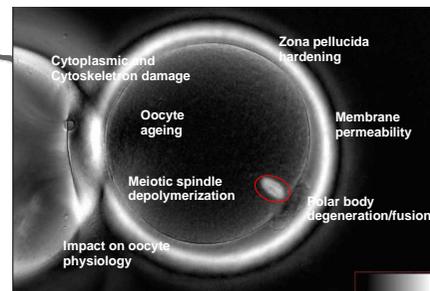
Cheng, Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet 1986

- Tecnica ormai consolidata ( 1<sup>^</sup>nato nel 1986, ad oggi più di 2000 nascite )
- Congelamento di ovociti maturi ( Metafase II ) e immaturi ( Profase I o VG, con successiva IVM ) con metodiche slow-freezing o di vitrificazione
- Tassi di fertilizzazione e gravidanza pressocchè comparabili a quelli ottenuti da ovociti freschi nelle donne giovani

Noyes N et al. 2009; ASRM 2013

### Danni da congelamento:

- Lisi cellulare
- Formazione di cristalli di ghiaccio
- Irrigidimento della zona pellucida
- Alterazioni del fuso mitotico, del citoscheletro e dell'integrità della membrana
- Frammentazione della cromatina





## Agonisti del GnRH

Argomento controverso, studi retrospettici, non-controllati, non unanimità di criteri

- La somministrazione di GnRHa provoca una soppressione transitoria della funzionalità gonadica, inducendo uno stato simil-prepubere, potenzialmente prevenendo la deplezione dei follicoli mantenendoli in uno stato quiescente



Rodriguez-Wallberg and Oktay Cancer Management and Research 4 March 2014



- Il pool di follicoli primordiali si trovano già in uno stato non-proliferante
- Mancano dei recettori per FSH, non reclutabili dalle gonadotropine

### Utility of gonadotropin-releasing hormone agonists for fertility preservation in young breast cancer patients: the benefit remains uncertain

N. H. Turner<sup>1</sup>, A. Partridge<sup>2</sup>, G. Sanna<sup>1</sup>, A. Di Leo<sup>1</sup> & L. Biganzoli<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Sandro Pignani<sup>1</sup> Medical Oncology Department, Hospital of Prato, Istituto Toscano Tumori, Prato, Italy; <sup>2</sup>Dana-Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospital, Boston, USA

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

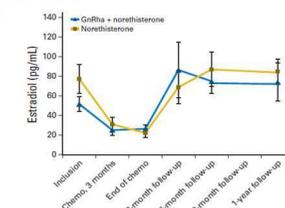
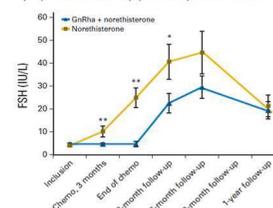
ORIGINAL REPORT

Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist for the Prevention of Chemotherapy-Induced Ovarian Failure in Patients With Lymphoma: 1-Year Follow-Up of a Prospective Randomized Trial

Isabelle Demonceau, Pauline Brice, Fedra A. Paganoni, Alain Kermis, Isabelle Gaillard, Pierre Zaech, Rene-Olivier Casanova, Eric Van Den Neste, Julie Dechen, Vivienne De Maerecler, Dominique Bron, and Yves Engelen

#### Conclusion

Approximately 20% of patients in both groups exhibited POF after 1 year of follow-up. Triptorelin was not associated with a significant decreased risk of POF in young patients treated for lymphoma but may provide protection of the ovarian reserve.



## Crioconservazione tessuto ovarico

Tecnica sperimentale

- Per ➤ **Pazienti in età pre-pubere**  
 ➤ **Mancanza di tempo**  
 ➤ **Controindicazione alla stimolazione ormonale**

Rimozione LPS di frammenti di corticale ovarica, ricca di follicoli primordiali

I frammenti vengono crioconservati a -196°C



Reimpianto del tessuto decongelato tramite due LPS a 7 giorni di distanza nell'autotrapianto ortotopico o con semplice intervento di piccola chirurgia in sede eterotopica ( sottocute )

Ripresa della funzionalità endocrina: 4,7 mesi Janse et al, 2011  
 Valori ormonali mantenuti in range fino a 7 anni! Rodriguez, 2014  
 30 nascite (2004, Donnez) sia spontanee che con IVF  
 Rischio di reintrodurre cellule neoplastiche!

Autotransplantation of ovarian tissue in patients who have suffered from systemic hematologic malignancy is not recommended due to the high risk of retransmission of malignancy, and only patients with a cancer diagnosis associated

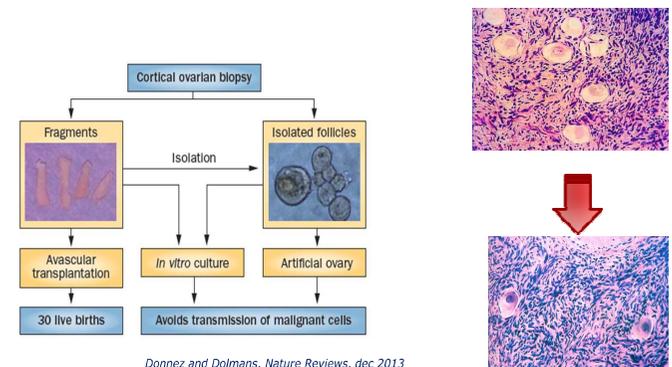
### Letrozolo

- .Potente inibitore di III<sup>^</sup>gen. dell'aromatasi
- .Sopprime i livelli di E<sub>2</sub>
- .Valida alternativa a pick-up su ciclo naturale
- .- 44% di rFSH

	Letrozolo + FSH*	Control <sup>b</sup>	P value
Age at IVF (yr)	36.4 ± 3.6	36.9 ± 3.9	0.44
Baseline FSH	7.1 ± 3.1	4.2 ± 2.0	<0.001
E <sub>2</sub> at HCG	483.4 ± 275.9	1464 ± 644.9	<0.001
Endometrial thickness	8.7 ± 2.3	10.9 ± 2.5	<0.001
Follicle no. > 17	4.0 ± 1.7	2.7 ± 1.2	<0.001
Peak follicle size (mm)	21.5 ± 2.5	18.7 ± 1.5	<0.001
Total oocytes (n)	12.4 ± 7.0	11.1 ± 5.5	0.43
Mature oocytes (n)	8.7 ± 4.8	9.7 ± 5.1	0.43
Mature oocytes (%)	73.2 ± 22.9	86.3 ± 12.7	0.002
No. of 2 pn. zygotes	6.8 ± 4.0	6.9 ± 4.1	0.73
Fertilization rate	74.1 ± 24.1	73.3 ± 21.5	0.71
No. of days stimulated	11.7 ± 2.3	12.2 ± 1.5	0.99
Total FSH dose	1317.8 ± 578.2	2382.5 ± 1062.8	<0.001

.h-CG a 19.5-20.5 mm

- .Comparato al Tamoxifene
- Picco di E<sub>2</sub> significativamente inferiore
- Maggior n. di follicoli >17mm
- Maggior n. di ovociti maturi
- Maggior n. di embrioni





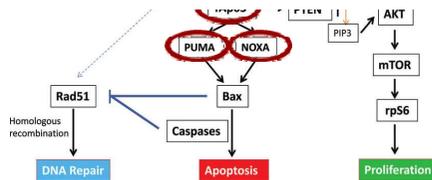
## Il futuro scientifico...

- Molecole che impediscano il reclutamento dei follicoli primordiali e il successivo burn-out

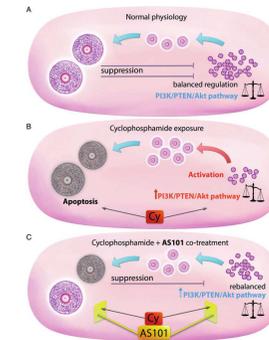
Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: possible roles for hormonal and non-hormonal attenuating agents

Hadassa Roness<sup>1,2</sup>, Lital Kalich-Philosoph<sup>1,2</sup>, and Dror Meiorov<sup>1,3</sup>

- Deplezione dei follicoli secondari elimina la regolazione negativa sui follicoli primordiali, attivandoli con lo scopo di rimpiazzare la corte dei follicoli in crescita



- Imatinib
- Talidomide
- Sfingosina-1-fosfato
  - AS101

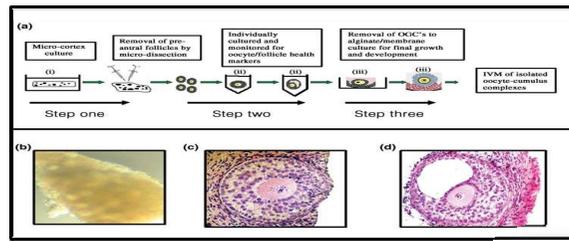


- Studi in vitro
- Potenziali interferenze con CT
- Teratogenicità

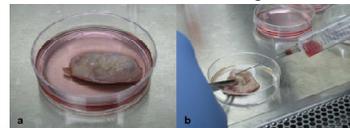
**“fertoprotective adjuvant therapy”**

## Il futuro scientifico...

- Aggirare il rischio di reintroduzione di cellule neoplastiche attraverso l'autotrapianto di tessuto ovarico
- Ridurre il danno da ischemia e riperfusione nell'autotrapianto
- Crescita in vitro di follicoli isolati dalla corticale ovarica dallo stadio primordiale fino al follicolo ovulatorio con la produzione di un ovocita competente Telfer et al, 2008

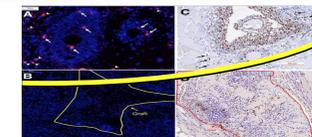


Huang et al, 2008



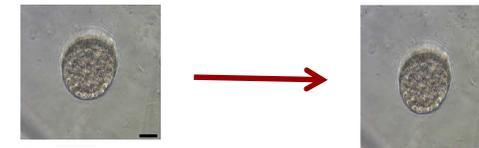
**A new step toward the artificial ovary: survival and proliferation of isolated murine follicles after autologous transplantation in a fibrin scaffold**

Valérie Loydx, M.D., Marie Madeleine Dolmans, M.D., Ph.D.,<sup>a,b</sup> Julia Vanacker, Ph.D.,<sup>a</sup> Camille Legat<sup>a</sup>, Cristina Fontelo-Moya, B.Sc., Jacques Dornes, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> and Christiane Andrade Amorim, V.M.D., Ph.D.<sup>a</sup>



**Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation**

J. Smits<sup>1,11,12</sup>, M.M. Dolmans<sup>2</sup>, J. Donnez<sup>2</sup>, J.E. Fortune<sup>3</sup>, O. Hovatta<sup>4</sup>

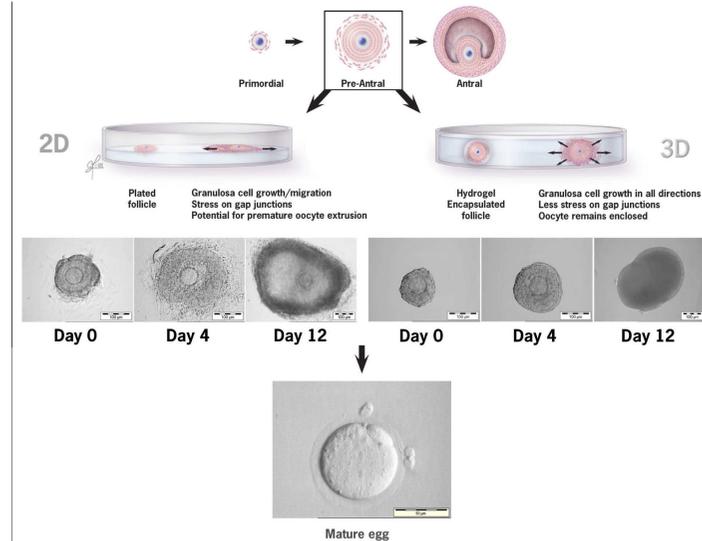


- Utilizzo di sistemi di bio-ingegneria per creare matrici 3D  
importanza dell'architettura



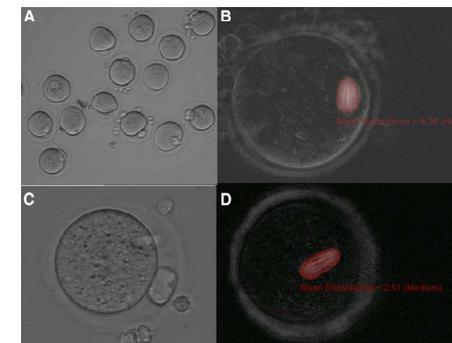
## Il futuro scientifico...

- Nella specie umana i follicoli aumentano dai 30-50  $\mu\text{m}$  della fase primordiale ai 100-200  $\mu\text{m}$  della fase pre-antrale fino ai 18 mm periovulatori
- Gap junction tra ovocita e cellule della granulosa per raggiungere la competenza meiotica
- Sistemi 2D non mantengono l'arrangiamento spaziale cellula-cellula necessario per controllare la differenziazione e modulare la risposta ai segnali biochimici dell'ECM



### “Scaffold” 3D

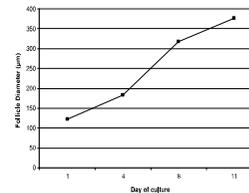
- Non citotossici
- Elastici
- Garantire scambio di gas e nutrienti
- Resistenti
- Micro-canali per la diffusione





Three dimensional culture of fresh and vitrified mouse pre-antral follicles in a hyaluronan-based hydrogel: a preliminary investigation of a novel biomaterial for in vitro follicle maturation

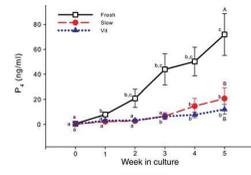
Nina Desai<sup>1\*</sup>, Faten Abdelhafez<sup>1</sup>, Anthony Calabro<sup>2</sup> and Tommaso Falcone<sup>1</sup>



Rhesus macaque



- Hydrogel di ialuronato di tiamina su cui sono stati messi in coltura follicoli pre-antrali di topo per 12 giorni
- Sopravvivenza: 62%
- 47% degli ovociti in MII
- Responsivi all'FSH
- Funzione steroidogenica mantenuta



Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix

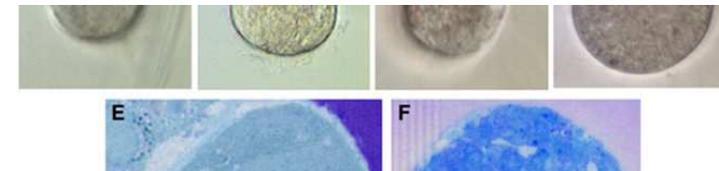
Christiani A. Amorim, Anne Van Langendonckt, Anu David, Marie-Madeleine Dolmans, and Jacques Donnez<sup>1</sup>

- 159 follicoli isolati tramite digestione enzimatica da biopsie ovariche di quattro pazienti (25-35y), crioconservati e congelati
  - Coltura in matrice 3D di alginato di calcio per 7 giorni
- Valutazione qualitativa: integrità della membrana basale, assenza di corpi picnotici, densità cellulare, integrità dell'ovocita
  - Tasso di sopravvivenza: 90%

Ovarian Follicle Culture: Advances and Challenges for Human and Non-human Primates

Evelyn E Telfer, Ph.D., FSB<sup>1,2</sup> and Mary B. Zelinski, Ph.D.<sup>3,4</sup>

I follicoli hanno raggiunto lo stadio antrale, sono risultati steroidogenicamente attivi e hanno prodotto ovociti maturi





## Il futuro legale...

La Corte Costituzionale, con sentenza 162 del 2014, ha dichiarato l'**incostituzionalità** dell'articolo 4, comma 3, della legge 19 febbraio 2004, n. 40, norme in materia di procreazione medicalmente assistita, ai sensi del quale "è vietato il ricorso a tecniche di procreazione medicalmente assistita di tipo eterologo".

La Corte ritiene, poi, che non si determini alcuna incertezza circa l'identificazione dei casi nei quali è legittimo il ricorso alla tecnica. Infatti, in applicazione dei principi e delle norme contenute nella l. n. 40 del 2004, emerge come sia possibile ricorrere alla tecnica eterologa:

- in riferimento al caso in cui sia stata accertata l'esistenza di una patologia che sia causa irreversibile di sterilità o infertilità assoluta;
- qualora non vi siano altri metodi terapeutici efficaci per rimuovere tali cause e sia stato accertato, mediante atto medico, il carattere assoluto delle stesse;
- sul piano soggettivo, da parte di coppie di maggiorenni di sesso diverso, coniugate o conviventi, in età potenzialmente fertile, entrambi viventi;
- secondo le linee guida ministeriali contenenti l'indicazione delle procedure e delle tecniche di procreazione, opportunamente aggiornate per la species eterologa, nelle strutture appositamente individuate ai sensi della legge.

Infine, la Corte chiarisce che i figli nati da fecondazione eterologa hanno lo stesso status dei figli nati nel matrimonio o dei figli riconosciuti dalla coppia che ha espresso la volontà di ricorrere alle tecniche di PMA.



Sentenza 162/2014  
Giudizio GIUDIZIO DI LEGITTIMITÀ COSTITUZIONALE IN VIA INCIDENTALE  
Presidente **SILVESTRI** - Redattore **TESAURO**  
Udienza Pubblica del 08/04/2014 Decisione del 09/04/2014  
Deposito del 10/06/2014 Pubblicazione in G. U. 18/06/2014  
Norme impugnate: Artt. 4, c. 3°, 9, c. 1° e 3°, e 12, c. 1°, della legge 19/02/2004, n. 40.  
Massime:  
Atti decisi: **ordd. 135, 213 e 240/2013**

SENTENZA N. 162

ANNO 2014

REPUBBLICA ITALIANA  
IN NOME DEL POPOLO ITALIANO

LA CORTE COSTITUZIONALE

composta dai signori: Presidente: Gaetano SILVESTRI; Giudici: Luigi MAZZELLA, Sabino CASSSESE, Giuseppe TESAURO, Paolo Maria NAPOLITANO, Giuseppe FRIGO, Alessandro CRISCUOLO, Paolo GROSSI, Giorgio LATTANZI, Aldo CAROSI, Mario CARTABIA, Sergio MATTARELLA, Mario Rosario MORELLI, Giancarlo CORAGGIO, Giuliano AMATO,

ha pronunciato la seguente

SENTENZA

nei giudizi di legittimità costituzionale degli artt. 4, comma 3, 9, commi 1 e 3, e 12, comma 1, della legge 19 febbraio 2004, n. 40 (Norme in materia di procreazione medicalmente assistita), promossi dal Tribunale ordinario di Milano con ordinanza dell'8 aprile 2013, dal Tribunale ordinario di Firenze con ordinanza del 29 marzo 2013 e dal Tribunale ordinario di Catania con ordinanza del 13 aprile 2013, rispettivamente iscritte ai nn. 135, 213 e 240 del registro ordinanze 2013 e pubblicate nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica nn. 24, 41 e 46, prima serie speciale, dell'anno 2013.