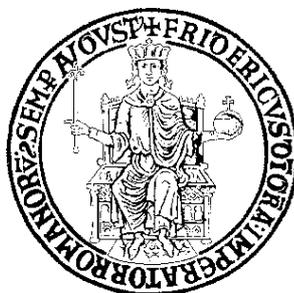


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Dottorato in Neuroscienze

Coordinatore del Dottorato Ch.mo Prof Maurizio Tagliatela

**Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed
Odontostomatologiche**

**Ruolo degli Agonisti del GnRH in pazienti affette da
carcinoma mammario**

RELATORE
Ch.mo Prof.
Carlo Alviggi

CANDIDATO
Roberta Vallone

ANNO ACCADEMICO 2018/2019

INDICE

INTRODUZIONE	4
1. AGONISTI DEL GNRH.....	6
2. PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ IN PAZIENTI ONCOLOGICHE	10
2.1 Cause iatrogene di infertilità.....	10
2.2 Le principali procedure di preservazione della fertilità.....	16
3. CENNI DI TERAPIA ORMONALE ADIUVANTE IN Ca MAMMARIO.....	25
3.1 Modulatori selettivi del recettore degli estrogeni (SERMS): Tamoxifene.....	35
3.2 Inibitori di aromatasi... ..	37
3.3 Agonisti del GnRH nella terapia adiuvante	40
4. EFFETTI ENDOCRINO-GINECOLOGICI DELLE TERAPIE ADIUVANTI.....	42
5. SEZIONE SPERIMENTALE.....	47
GnRHa in pazienti in trattamento ormonale adiuvante	
5.1 Basi scientifiche.....	47
5.2 Materiali e metodi	48
5.2.1 <i>Analisi statistica</i>	51
5.3 Risultati	51
5.4 Discussione.....	56
6. SEZIONE SPERIMENTALE.....	58
Stimolazione ovarica controllata con gonadotropine esogene in pazienti con K mammario: Profili ormonali e outcomes riproduttivi – ruolo del GnRHa nel triggering	
6.1 Basi scientifiche.....	58
6.2 Materiali e metodi	60
6.3 Risultati	64
6.4 Discussione	69
BIBLIOGRAFIA	75

INTRODUZIONE

Ogni giorno in Italia vengono registrati almeno 30 nuovi casi di tumore in pazienti in età fertile. La comparsa di sterilità ed infertilità in seguito alle terapie oncologiche richieste rappresenta una tematica rilevante non solo per il progressivo miglioramento delle cure e, quindi, della prognosi di questi pazienti, ma anche per il progressivo spostamento dell'età del primo concepimento che si registra annualmente in Italia e negli altri paesi europei. Le linee guida di tutto il mondo sottolineano come per tutti i pazienti in età riproduttiva con diagnosi di tumore si rendano necessarie, in *primis*, un'adeguata informazione sul rischio di riduzione e/o perdita di fertilità in seguito alle terapie oncologiche e, in secondo luogo, la messa in atto di interventi mirati alla preservazione della fertilità. A tal proposito, il Centro di Sterilità ed Infertilità di Coppia (Programma Intradipartimentale di Endocrinologia della Riproduzione ed Oncofertilità) della AOU Federico II, si è fatto promotore di un progetto mirato alla “Realizzazione di una rete regionale interdisciplinare per l’attuazione di percorsi diagnostico-terapeutici finalizzati alla preservazione della fertilità in giovani affetti da patologia neoplastica e al successivo supporto alla procreazione dei soggetti guariti”, autorizzato dalla Regione Campania (Decreto Commissario ad Acta n. 105 del 01/10/2014)

Da ciò si deduce il ruolo importante del ginecologo e dell'oncologo nell'offrire strategie di preservazione della fertilità con la possibilità di soddisfare un futuro desiderio di genitorialità e di garantire un continuo e adeguato *follow up* endocrino-ginecologico per tali pazienti.

L'incremento di giovani “survivors” comporta non solo la gestione di problematiche di salute riproduttiva ma anche, nel caso specifico del tumore mammario, dell'impatto delle terapie adiuvanti sulla qualità di vita.

Il paziente oncologico, per definizione, è un paziente complesso che richiede necessariamente un'integrazione multidisciplinare che garantisca un approccio globale delle cure sin dalla sua diagnosi. In particolare, per le donne con

carcinoma mammario, è necessaria una stretta collaborazione tra l'equipe oncologica e il ginecologo, al fine di definire la migliore strategia terapeutica da adottare, tenendo conto dei suoi possibili effetti endocrino-ginecologici.

Nel corso di questo lavoro di tesi, è stato utilizzato il modello delle pazienti oncologiche affette da carcinoma mammario per analizzare il ruolo degli agonisti del *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) nella modulazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio nelle diverse situazioni cliniche. Infatti, la stessa molecola, come formulazione *depot*, può essere sfruttata per il potente effetto di desensibilizzazione ipofisaria con gli indubbi vantaggi nel trattamento adiuvante del carcinoma mammario con recettori ormonali positivi (estradolo – E e Progesterone – Pg). Tale effetto è tra i possibili meccanismi d'azione invocati anche per le strategie di preservazione della fertilità basate su protezione gonadica.

Al contrario, in particolare nella formulazione giornaliera, tale molecola è utilizzata per l'induzione della maturità ovocitaria sfruttando l'effetto di stimolazione iniziale e rilascio di gonadotropine insito nel meccanismo farmacodinamico.

Pertanto, partendo da un'attenta analisi della letteratura vigente, in questo lavoro, nella sezione sperimentale saranno presentati i dati relativi al nostro Centro con interessanti spunti di ricerca in merito all'interazione degli Agonisti del GnRH e gli inibitori di aromatasi sia in *setting* di preservazione della fertilità che in corso di terapie adiuvanti nei "cancer survivors".

Saranno descritte in breve le caratteristiche dell'ormonoterapia adiuvante nel tumore della mammella. In particolar modo, verrà attenzionato l'impiego in premenopausa dell'exemestane, inibitore steroideo dell'aromatasi di terza generazione. Oggetto di studio saranno gli effetti ormonali e l'inattesa attività ovarica (sulla base dei dati riportati in letteratura) osservata nelle pazienti in trattamento con questo farmaco presso il nostro Dipartimento.

Per quanto concerne le pazienti afferenti al nostro Centro candidate alle

strategie di preservazione della fertilità, saranno analizzati i profili ormonali e riproduttivi in corso di stimolazione ovarica controllata con protocollo adattato con gonadotropine esogene e letrozolo (inibitore dell'aromatasi non steroideo) e il tipo di strategia di induzione dell'ovulazione con i diversi farmaci ad oggi disponibili in commercio (Gonadotropina corionica umana- HCG e Agonisti del GnRH).

1 AGONISTI DEL GnRH

L'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH) ed i suoi analoghi sono stati ampiamente usati in medicina clinica da quando sono stati identificati e sintetizzati nel 1971. Il GnRH nativo stimola le cellule dell'ipofisi anteriore ed è usato per l'induzione dell'ovulazione in caso di amenorrea ipotalamica e policistici ovarica.

Gli agonisti del GnRH (GnRH-a), che hanno una potenza maggiore ed una emivita più lunga rispetto al GnRH nativo, producono una iniziale stimolazione delle cellule ipofisarie che provoca la secrezione dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) e dell'ormone luteinizzante (LH) e la conseguente risposta gonadica. Questa risposta è seguita dalla *down-regulation* e dall'inibizione dell'asse ipofisi-gonade.

Gli antagonisti del GnRH (GnRH-ant) sopprimono prontamente le gonadotropine ipofisarie tramite la competizione per il recettore del GnRH (GnRH-R), evitando quindi la fase iniziale di stimolazione provocata dai GnRH-a. La sospensione del trattamento con GnRH-ant conduce a un rapido e prevedibile recupero dell'asse ipofisi-gonade. Il GnRH nativo è un decapeptide (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) prodotto e rilasciato in maniera pulsatile dal sistema neuronale GnRH secernente, costituito da 1000-3000 elementi neuronali. Nei primati, compreso l'uomo, questi elementi sono localizzati principalmente nel nucleo arcuato dell'ipotalamo medio-basale e

nell'area preottica dell'ipotalamo anteriore. Gli assoni dei neuroni GnRH secernenti inviano proiezioni a diversi siti nel cervello ed una delle proiezioni di maggiore rilievo è quella che dall'ipotalamo medio-basale va all'eminenza mediana, terminando in un plesso di bottoni vascolari sul vaso portale primario che rilascia il GnRH alla cellula gonadotropa. Raggiunta l'ipofisi anteriore attraverso il sistema portale, l'ormone si lega ai recettori specifici sull'adenipofisi, dove stimola la sintesi e la secrezione dell'LH e dell'FSH, indispensabili per la funzione riproduttiva ovarica e testicolare.

Quando viene somministrato, il GnRH provoca un rapido rilascio di LH ed una minore secrezione di FSH. La periodicità e l'ampiezza del ritmo pulsatile della secrezione di GnRH/gonadotropine riveste un ruolo fondamentale nella regolazione delle funzioni gonadiche.

Il GnRH si lega ai recettori specifici localizzati sulla membrana plasmatica della cellula ipofisaria. Il legame induce una dimerizzazione dei recettori e la formazione di piccoli gruppi che vengono internalizzati. Successivamente alla internalizzazione, il complesso ormone-recettore subisce una degradazione nei lisosomi ed una frazione dei recettori viene riportata sulla membrana plasmatica, partecipando così ad un riciclo in relazione alla *up-regulation* dei recettori su stimolo del GnRH.

Una seconda forma di GnRH (GnRH II) è ubiquitaria e mantenuta nella sua struttura indipendentemente dalla specie (dai pesci agli esseri umani), suggerendo che abbia importanti funzioni. In molte specie di vertebrati vi è una terza forma di GnRH (localizzato nel proencefalo dei pesci), indicata come GnRH III, ma nei rettili, uccelli e mammiferi soltanto i GnRH I e II sono apparentemente presenti. Il GnRH II è distribuito in diverse regioni del sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP) ed in tessuti non neuronali. Il recettore del GnRH II (GnRH II-R) è stato recentemente clonato dagli anfibi e dai mammiferi. È altamente selettivo per il GnRH II, ha una distribuzione simile al GnRH II nel sistema nervoso e, soprattutto, nelle zone connesse con il comportamento sessuale. È stato trovato anche nei tessuti dell'apparato

riproduttivo. Una funzione accertata del GnRH II è l'inibizione dei canali del potassio (K⁺) tramite il GnRH II-R nei gangli simpatici degli anfibi e potrebbe quindi comportarsi, attraverso questo meccanismo, come un neuromodulatore nel SNC. La conservazione della sua struttura in 500 milioni di anni e la sua ampia distribuzione nei tessuti suggeriscono che il GnRH II abbia diverse funzioni in ambito riproduttivo e non riproduttivo, per cui costituisce un settore di ricerca interessante.

Gli aminoacidi del GnRH con funzioni cruciali sono alle posizioni 1, 2, 3, 6 e 10. La posizione 6 è coinvolta nel clivaggio enzimatico, le posizioni 2 e 3 nel rilascio delle gonadotropine e le posizioni 1, 6 e 10 sono importanti per la struttura tridimensionale.

Allo scopo di aumentare la potenza e la durata d'azione del GnRH, tramite modificazioni della struttura molecolare di questo decapeptide, sono stati sintetizzati e sono disponibili per l'uso clinico più di 2000 analoghi con proprietà agoniste o antagoniste sulle cellule gonadotrope dell'ipofisi anteriore per il trattamento di diverse condizioni che richiedono la soppressione temporanea e reversibile o la stimolazione della secrezione delle gonadotropine. La sostituzione di un aminoacido in posizione 6 o 10 risulta in analoghi con attività agonista, mentre la modifica in posizione 2 o 3 risulta in analoghi con proprietà antagoniste. La delezione di un aminoacido in posizione 10, inoltre, aumenta l'affinità di legame degli analoghi.

L'inclusione dei GnRH-a nei protocolli di stimolazione ovarica per le tecniche di fecondazione *in vitro* ha portato miglioramenti significativi dei risultati:

- Le percentuali di sospensione del ciclo sono diminuite;
- Le percentuali di gravidanza sono aumentate.

Infatti, prima che i GnRH-a fossero disponibili, circa il 20% dei cicli stimolati nell'ambito di un programma di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) venivano sospesi a causa dei picchi prematuri di LH. Gli analoghi del GnRH costituiscono dei potenti agenti terapeutici, rivelatisi molto utili in diverse indicazioni cliniche.

In particolare, gli agonisti del GnRH (triptorelin, goserelin, buserelin, leuprolide), sono ottenuti dalla sostituzione di un aminoacido (posizione 6 o 10) nella molecola nativa del GnRH. Questa sostituzione conferisce loro un'emivita più lunga e una maggiore affinità recettoriale rispetto del GnRH nativo, tale da determinare l'80% dell'effetto biologico con solo il 5% dei recettori occupati. Gli analoghi possono essere somministrati in modo intermittente, così da mimare il rilascio fisiologico del GnRH endogeno (ad esempio nel trattamento dell'infertilità o in condizioni in cui vi è deficit endogeno di GnRH, come la sindrome di Kallman) oppure in modo continuo. Quest'ultima modalità di somministrazione trova indicazione nella terapia dei carcinomi ormono sensibili in particolare carcinoma prostatico e mammario. La stimolazione continua dei recettori ipofisari, come suddetto, dopo un'iniziale fase di flare up, con la conseguente risposta gonadica, determina una *down-regulation* di tali recettori. La somministrazione di elevate dosi di GnRH nativo o di analoghi agonisti causa quindi la desensibilizzazione dell'ipofisi, con la conseguente riduzione della gametogenesi gonadica e della sintesi degli ormoni steroidei e peptidici. Grazie all'effetto di potente desensibilizzazione ipofisaria gli agonisti del GnRH trovano ad oggi vasta applicazione terapeutica. In particolare, in ambito ginecologico sono impiegati in patologie quali endometriosi e fibromatosi uterina, pubertà precoce, nella riproduzione assistita e nella terapia del carcinoma prostatico e mammario. Negli ultimi anni tale farmaco ha trovato largo impiego per la preservazione della fertilità nei pazienti oncologici in relazione agli effetti di soppressione ovarica e antiapoptotici. Infine, nell'ambito della Medicina della Riproduzione, le formulazioni giornaliere di agonisti del GnRH sono state utilizzate con successo per l'induzione dell'ovulazione in alternativa all'HCG, sfruttando il meccanismo d'azione iniziale associato al rilascio di gonadotropine con particolare riguardo all'LH. Con questo approccio si riduce il rischio di Sindrome da

Iperstimolazione Ovarica, una tra le più temibili complicanze dei percorsi di PMA.

2 PRESERVAZIONE DELLA FERTILITA' NELLA PAZIENTE ONCOLOGICA

2.1 Cause iatrogene di infertilità

La fertilità femminile ha una variabilità interindividuale, si osserva una lenta ma costante diminuzione della fertilità nelle donne di età compresa tra 30 e 35 anni, seguita da un declino accelerato tra le donne di età superiore ai 35 anni. Sebbene l'età cronologica sia il fattore predittivo più importante della risposta ovarica all'ormone follicolo-stimolante (FSH), il tasso di invecchiamento riproduttivo e la sensibilità ovarica alle gonadotropine varia considerevolmente da individuo a individuo. Entrambi i fattori ambientali e genetici contribuiscono all'esaurimento del pool di ovociti ovarici e alla riduzione della qualità degli ovociti (Alviggi *et al.*, 2009).

A partire dalle primissime fasi di vita si assiste ad un progressivo depauperamento del patrimonio follicolare. Il numero massimo di follicoli primordiali immaturi è 6-7 milioni circa alla ventesima settimana di gestazione; diminuisce a 1-2 milioni alla nascita per poi ridursi a 300.000-500.000 alla pubertà, a 25.000 a circa 37 anni e 1.000 in prossimità della menopausa (Nelson *et al.*, 2013).

La riserva ovarica è rappresentata principalmente da follicoli primitivi, che possono rimanere in tale stadio primordiale anche per oltre quarant'anni prima di evolversi in primari. La riduzione fisiologica del patrimonio follicolare avviene in primo luogo perché durante la vita riproduttiva è necessario un continuo reclutamento dei follicoli primordiali per favorire i processi di selezione che precedono l'ovulazione (Wallace e Kelsey *et al.*, 2010). Tali follicoli possono andare incontro ad atresia in tutte le fasi dello

sviluppo. La quantità che viene attivata ad ogni ciclo rispecchia in maniera variabile il patrimonio totale di follicoli primari, con ampie differenze legate all'età. Quando si parla di riduzione della riserva ovarica (DOR – *Diminished ovarian reserve*) ci si riferisce alla diminuzione della quantità dei follicoli e quindi del potenziale riproduttivo femminile. La DOR implica una ridotta fertilità, intesa come capacità di raggiungere una gravidanza spontanea, sia una scarsa risposta ovarica alla stimolazione alle gonadotropine in caso di tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA). Essa è annoverata, infatti, tra le principali cause di sterilità. Nelle donne la fertilità può essere compromessa da qualsiasi trattamento che riduca il numero dei follicoli primordiali, che impatti negativamente sull'equilibrio ormonale o che interferisca con il funzionamento delle ovaie, delle tube, dell'utero o della cervice. I trattamenti antineoplastici sono associati ad un elevato rischio di infertilità temporanea o permanente (AIOM, 2018), ed impattano in maniera significativa sulla riserva ovarica. La preservazione della fertilità rappresenta un tema di notevole rilevanza nei pazienti affetti da cancro (Loren AW *et al.*, 2013) non soltanto in virtù del miglioramento della sopravvivenza dei tumori in età pediatrica e giovanile (Lee SJ *et al.*, 2006; Schover LR *et al.*, 2009; Peccatori FA *et al.*, 2013), ma anche per il ritardo progressivo dell'età del primo concepimento (AIOM, 2018; Astolfi P *et al.*, 2002). Le linee guida nazionali e internazionali sottolineano come le conseguenze sulla futura fertilità, nonché la messa in atto di strategie preventive per la preservazione della stessa, vadano discusse con i pazienti prima di intraprendere il trattamento oncologico (Loren AW *et al.*, 2013; AIOM 2018). Ad eccezione dei casi di sindrome neoplastica ereditaria, dove è opportuno un attento *counseling* genetico, per entrambi i sessi non sussistono controindicazioni alla genitorialità una volta avvenuta la guarigione dal cancro (Hudson MM *et al.*, 2010; van der Kaaij MA *et al.*, 2012). Non vi sono infatti evidenze di anomalie congenite o rischio di cancro nella prole di pazienti con storia di tumore (AIOM, 2018).

Inoltre, la gravidanza non si associa a prognosi infausta nemmeno per i tumori ormono-sensibili come il carcinoma mammario (AIOM, 2018).

Danno gonadotossico causato da chemioterapia e terapia endocrina

Il trattamento chemioterapico comporta una perdita follicolare, probabilmente mediata dalla morte cellulare programmata (apoptosi), e risulta spesso fortemente gonadotossico. Nuove evidenze suggeriscono, inoltre, che il danno al patrimonio follicolare potrebbe realizzarsi anche attraverso un danno indiretto sulle cellule somatiche, in particolare sulle cellule della granulosa (Morgan S *et al.*, 2012). I fattori principali che influiscono sull'esaurimento precoce della funzione ovarica (POF – *Premature Ovarian Insufficiency*) sono l'età della paziente, la dose cumulativa di chemioterapico e il tipo di agente citotossico. (Bonadonna G *et al.*, 1985; Bines J *et al.*, 1996; Goodwin PJ *et al.*, 1999; Meirow D *et al.*, 1999; Sonmezer *et al.*, 2004). Le pazienti più suscettibili risultano essere quelle con età superiore ai 35, in quanto le ovaie di pazienti più giovani tollerano dosi maggiori di farmaci citotossici. La pregressa funzione ovarica della paziente è sicuramente un indice predittivo della disfunzione ovarica conseguente alla chemioterapia (Lee *et al.*, 2006). Qualora la terapia oncologica colpisca la coorte di follicoli in accrescimento essa potrà determinare un'amenorrea transitoria. Al contrario, qualora coinvolga i follicoli residuali, causerà probabilmente un'amenorrea permanente (Oktay *et al.*, 2006). Sono la dose e il tipo di farmaco chemioterapico che incidono sulla deplezione follicolare (Sonmezer *et al.*, 2006), anche se non è tuttora chiaro se la durata e la dose del farmaco possano considerarsi fattori indipendenti di rischio di esaurimento follicolare.

Gli agenti alchilanti (in particolare: ciclofosfamide, ifosfamide, nitrosuree, clorambucil, melfalan, busulfano, procarbazine, carmustina, lomustina) utilizzati nel trattamento del cancro della mammella, sono quelli maggiormente

tossici per il tessuto ovarico (Fisher M *et al.*, 1996). Essi hanno un impatto sia sulle cellule quiescenti che in attiva replicazione, in quanto non sono ciclo-specifici. La loro azione si esplica in maniera diretta sul DNA con effetti tossici principalmente sui follicoli primordiali. Anche i derivati del platino, come carboplatino e cisplatino hanno effetti negativi (Simon B *et al.*, 2005). Al contrario, gli agenti ciclo-specifici (antimetaboliti) come il methorexate e il 5-fluorouracile presentano un basso rischio, analogo a vincristina, vinblastina, bleomicina e dactinomicina. I dati relativi al rischio da taxani non sono ancora conclusivi (**Figura 1**).

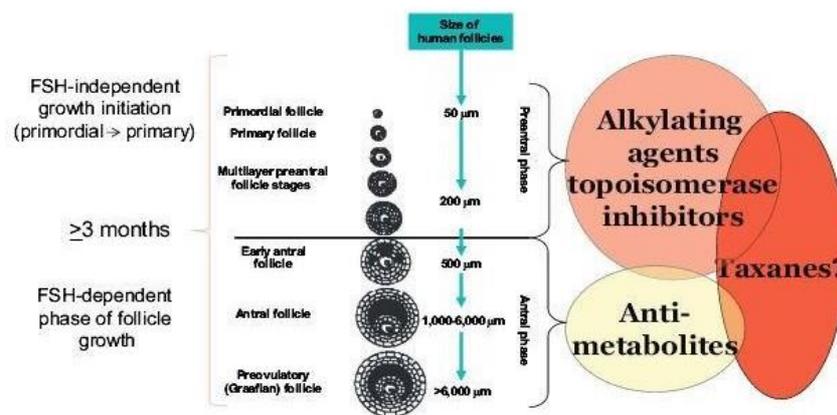


Figura 1. Effetti dei chemioterapici usati per il trattamento del cancro della mammella sui differenti stadi della crescita follicolare.

La ciclofosfamide è stata uno dei chemioterapici maggiormente studiati su modelli animali da cui è risultato una diretta proporzionalità tra dose di farmaco somministrata (20-100 mg/kg) e danno follicolare, sebbene quest'ultimo possa essere determinato anche da dosi più basse (Meirow D *et al.*, 1999). Ne risulta che ogni somministrazione addizionale di ciclofosfamide, data la dose dipendenza della sua tossicità, porta ad una maggiore probabilità di riduzione della riserva ovarica ed esaurimento follicolare precoce da 4 a 9,3 volte

maggiore rispetto ai controlli sani (Byrne *et al.*, 1992; Meirrow D *et al.*, 2001). Le pazienti sottoposte a trattamento chemioterapico presentano alterazioni e irregolarità mestruali, alcune di esse anche amenorrea. La regolare fisiologia del ciclo mestruale riprende, in genere, dopo circa 3-6 mesi dall'interruzione del trattamento stesso; (Bines J *et al.*, 1996; Brewer M *et al.*, 1999; Tangir J *et al.*, 2003; Wallace WH *et al.*, 1989). Anche in questo caso il ritorno ad una regolarità mestruale dopo un periodo di amenorrea post-chemioterapia è età-dipendente, con un ripristino di funzionalità in maggiore percentuale in donne al di sotto dei 40 anni di età (22-56%) rispetto a quelle con età superiore ai 40 anni (11%) (Bines J *et al.*, 1996). Per tale motivo non si può valutare un eventuale danno gonadico considerando solo l'attività mestruale: infatti molte donne, nonostante un'apparente regolarità mestruale, presentano una ridotta riserva ovarica. Quindi la ripresa mestruale dopo l'assunzione dei farmaci antitumorali non è segno di preservata fertilità. Sebbene nelle giovani non si riscontrerà nell'immediato periodo post-trattamento un grave deterioramento del *pool* follicolare, a lungo termine ci sarà comunque un alto rischio di esaurimento ovarico prematuro (Schilsky LR *et al.*, 1981; Rivkees SA *et al.*, 1988; Sanders JE *et al.*, 1988; Teinturier C *et al.*, 1998; de Bruin JP *et al.*, 2004). Dunque, sia l'amenorrea che l'irregolarità mestruale non risultano essere degli indici affidabili per valutare l'eventuale infertilità determinata dal protocollo farmacologico oncologico.

Ugualmente importante risulta essere anche il riferimento al danno iatrogeno da terapia endocrina adiuvante. Il tamoxifene è uno dei principali farmaci impiegati ed è stato dimostrato che comporta un rischio di menopausa precoce in particolare dopo i 45 anni (Goodwin SJ *et al.*, 1999), indipendentemente dalla chemioterapia adoperata (Bines J *et al.*, 1996; Lee SJ *et al.*, 2006). La ripresa del flusso mestruale è età-dipendente in quanto al di sotto dei 40 anni è attesa nel 90% delle pazienti trattate contro il 70%, se la terapia è effettuata in donne con età superiore (Jonat W *et al.*, 2002).

Ad oggi, pur essendo molto elevato il rischio di deplezione follicolare, molte

donne non sono adeguatamente e esaustivamente informate sui potenziali effetti avversi della chemioterapia sulla funzione riproduttiva e non riescono spesso a comprendere le possibili conseguenze del trattamento (Duffy CM *et al.*, 2005).

Gonadotossicità da radioterapia

La radioterapia, analogamente alla chemioterapia, può impattare negativamente sulla funzione gonadica che è altamente suscettibile alle radiazioni ionizzanti. Queste ultime provocano un'interruzione del normale ciclo proliferativo cellulare e possono condurre ad un'estesa distruzione cellulare a livello ovarico, mediata dall'apoptosi, nonostante gli ovociti siano mitoticamente inattivi. È stato dimostrato che i follicoli primordiali risultano più radioresistenti rispetto a quelli maturi, di conseguenza la radiosensibilità varia rispetto alla fase di crescita follicolare. (Ogilvy-Stuart AL *et al.*, 1993). Anche in questo caso la paziente più giovane è meno vulnerabile al danno iatrogeno rispetto alle donne in età riproduttiva avanzata, che sono maggiormente predisposte all'esaurimento follicolare precoce. (Wallace WH *et al.*, 2005). Si stima che una dose compresa tra 5 e 20 Gy sull'ovaio è sufficiente per causare una permanente disfunzione gonadica, indipendentemente dall'età della paziente. Alla dose di 30 Gy la menopausa precoce è certa nel 60% delle donne con età inferiore a 26 anni. Oltre i 40 anni, laddove la conta follicolare ovarica è fisiologicamente inferiore, sono sufficienti dosi di 5 o 6 Gy per provocare un danno permanente (Fleischer RT *et al.*, 2011). Lo sviluppo uterino, nel caso di un eventuale gravidanza, può essere influenzato dalla radioterapia, così come vi è un rischio maggiore di aborto spontaneo e ritardo di crescita intrauterino. L'irradiazione dell'encefalo può determinare alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisario con conseguente amenorrea e sterilità per alterazione della normale produzione del *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) (Wo JY *et al.*, 2009). Il danno da radiazione incide sul DNA delle cellule follicolari con conseguente riduzione

della produzione di estradiolo da cui derivano alterazioni del trofismo endometriale seguite da sintomatologia simil menopausale. È stato dimostrato come i *markers* predittivi di esaurimento follicolare precoce per il trattamento radioterapico sono: la dose di irradiazione, l'età al momento dell'esposizione alla fonte di radiazioni ionizzanti e l'estensione del campo di irradiazione (Lushbaugh CC *et al.*, 1976; Bath LE *et al.*, 1999; Wallace WH *et al.*, 1989). Uno studio recente ha dimostrato che la dose richiesta per distruggere il 50% degli ovociti immaturi (LD50) risulti essere inferiore ai 2 Gy (Wallace WH *et al.*, 2003)

2.2 Le principali procedure di preservazione della fertilità

L'infertilità, come conseguenza di danno iatrogeno, ha determinato la necessità di offrire alla giovane paziente oncologica un corretto *counseling* multidisciplinare ma soprattutto riproduttivo per illustrare le migliori strategie disponibili per la preservazione dei gameti e la riduzione della tossicità gonadica. È fondamentale che il trattamento sia personalizzato in base alla paziente e al tipo di neoplasia per garantire i migliori risultati possibili. I principali metodi per la preservazione della fertilità disponibili, standard e sperimentali, sono divisi in due gruppi in relazione al meccanismo d'azione della tecnica adoperata:

- Protezione gonadica
 - schermatura gonadica con analoghi del GnRH
 - trasposizione ovarica

- Tecniche basate su PMA:
 - congelamento embrionario
 - congelamento ovocitario

- congelamento ovociti immaturi
- congelamento tessuto ovarico

Tra le tecniche di crioconservazione, ad oggi, l'unica che abbia dimostrato risultati riproducibili, oltre alla crioconservazione degli embrioni, vietata in Italia dalla legge 40/2004, è quella della crioconservazione degli ovociti maturi. Tuttavia, tra le altre opzioni ancora considerate sperimentali, la crioconservazione di tessuto ovarico viene comunemente proposta come alternativa in quanto ha dato negli ultimi anni risultati abbastanza riproducibili nelle pazienti in cui non è stato possibile effettuare stimolazione ovarica. (AIOM, 2018).

La scelta dipende da diversi fattori: età e riserva ovarica della paziente, tipo di trattamento, diagnosi, presenza o meno di un partner, possibilità che la neoplasia abbia metastatizzato alle ovaie e tempo a disposizione prima di iniziare il trattamento (Kim CH *et al.*, 2012). Sono stati proposti di recente specifici criteri di inclusione nel programma di preservazione della fertilità: (Jensen *et al.*, 2015; Wallace WH *et al.*, 2014):

- Età inferiore a 35 anni (variabile in base ai valori di antiMülleriano, AMH e Conta dei Follicoli antrali, AFC);
- Nessuna precedente chemioterapia o radioterapia se la paziente ha un'età superiore ai 15 anni alla diagnosi, ma è accettabile un precedente trattamento con chemioterapia o radioterapia non gonadotossica se la paziente ha un'età inferiore ai 15 anni alla diagnosi;
- Un'aspettativa di vita maggiore di 5 anni;
- Un alto rischio di POF (>50%);
- Consenso informato (dai genitori, dove sia possibile, paziente);
- Paziente non gravida e senza prole;
- Assenza di controindicazioni all'esecuzione della tecnica di preservazione;

- Assenza di malattia disseminata.

Occorre, infine, sottolineare che nella donna l'utilizzo di alcune di queste tecniche è associato a un ritardo nell'inizio della terapia antineoplastica da cui l'importanza di sottoporre il *counseling* riproduttivo il più precocemente possibile.

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 antitumorale.	Con questa metodica la letteratura riporta la nascita di più 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 poco 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.	-Trattamento effettuato prima e durante la chemioterapia; -metodo semplice e più economico; -preservazione della funzione ovarica; -complementare (ma non alternativa) alle tecniche di crioconservazione per la preservazione della fertilità.

Tabella 1. Riassunto delle strategie di preservazione della fertilità nella donna (AIOM, 2018)

Focus su Protezione gonadica con agonisti del GnRH

Il trattamento con agonisti del GnRH (GnRH-a), prima e durante la terapia antitumorale, è l'unico trattamento farmacologico disponibile per ridurre il rischio di deplezione dei follicoli ovarici. Il meccanismo d'azione di tali farmaci (triptorelina, goserelina, buserelina, leuprolide) si basa sull'osservazione che la chemioterapia colpisce maggiormente i tessuti con rapido *turn-over* cellulare e che, pertanto, uno stato indotto di inibizione dell'attività ovarica durante la terapia antiblastica potrebbe proteggere le ovaie stesse dall'effetto della chemioterapia (Rivkees *et al.*, 1988). È stato dimostrato come in età infantile e preadolescenziale le gonadi siano meno suscettibili al danno iatrogeno e che quindi l'effetto protettivo degli GnRH-a si basi sul ricreare una situazione simil prepuberale di ipogonadismo. Essi riducono la secrezione di FSH, sopprimendo la funzione ovarica, il reclutamento ovocitario, la perfusione utero-ovarica ed infine inibendo l'attivazione dei recettori del GnRH a livello gonadico (AIOM 2018). Il tutto comporterebbe una riduzione della tossicità farmacologica e del rischio di infertilità iatrogena. Dati preclinici in animali da laboratorio hanno confermato tale ipotesi (Ataya *et al.*, 1995).

Il trattamento chemioterapico può determinare un aumento della distruzione/apoptosi dei follicoli attivi e conseguentemente una riduzione della secrezione degli ormoni prodotti dai follicoli stessi nei differenti stadi di maturazione e differenziazione. La riduzione della secrezione degli steroidi sessuali, delle inibine e dell'AMH, determinerà una diminuzione della loro concentrazione plasmatica e, per il meccanismo di *feedback* negativo sull'ipotalamo e sull'ipofisi, aumenteranno i livelli di FSH. L'incrementata secrezione di FSH può determinare un accelerato reclutamento dei follicoli preantrali con conseguente maggiore sensibilità all'effetto gonadotossico della chemioterapia.

Questo circolo vizioso può quindi essere interrotto con la somministrazione dell'Agonista del GnRH che consente di prevenire l'aumento di FSH. La terapia

con l'agonista inoltre, inducendo un clima di ipoestrogenismo, ridurrebbe la perfusione di utero e ovaie; questo è un altro possibile meccanismo che potrebbe spiegare l'efficacia di tali farmaci nel ridurre la gonadotossicità da chemioterapia (Blumenfeld *et al.*, 2005). La ridotta vascolarizzazione ovarica determina, infatti, una minore esposizione della gonade al chemioterapico e comportare una minore gonadotossicità.

Tali evidenze confermano, quindi, la validità dell'impiego di GnRH-a principalmente nelle pazienti in epoca post-puberale ed in età adulta, non essendoci studi che supportano l'impiego in bambine affette da tumore e per le pazienti in epoca prepuberale. Uno studio condotto da Huser *et al.* ha dimostrato una proporzionalità indiretta tra dosi di chemioterapici utilizzati e efficacia dei GnRH-a. In pazienti affette da linfoma di Hodgkin, ha evidenziato una differenza statisticamente significativa in termini di salvaguardia della fertilità solo nel gruppo di donne con uno stadio non superiore al II (secondo la classificazione di Ann Arbor) per le quali erano stati utilizzati regimi terapeutici meno aggressivi (Huser *et al.*, 2008)

Le metanalisi pubblicate sull'argomento attualmente disponibili, le più recenti pubblicate dal gruppo diretto dalla Del Mastro (Tabella 2), hanno dimostrato in maniera uniforme il beneficio della somministrazione degli agonisti del GnRH nella preservazione della funzione ovarica (Del Mastro L *et al.*, 2014).

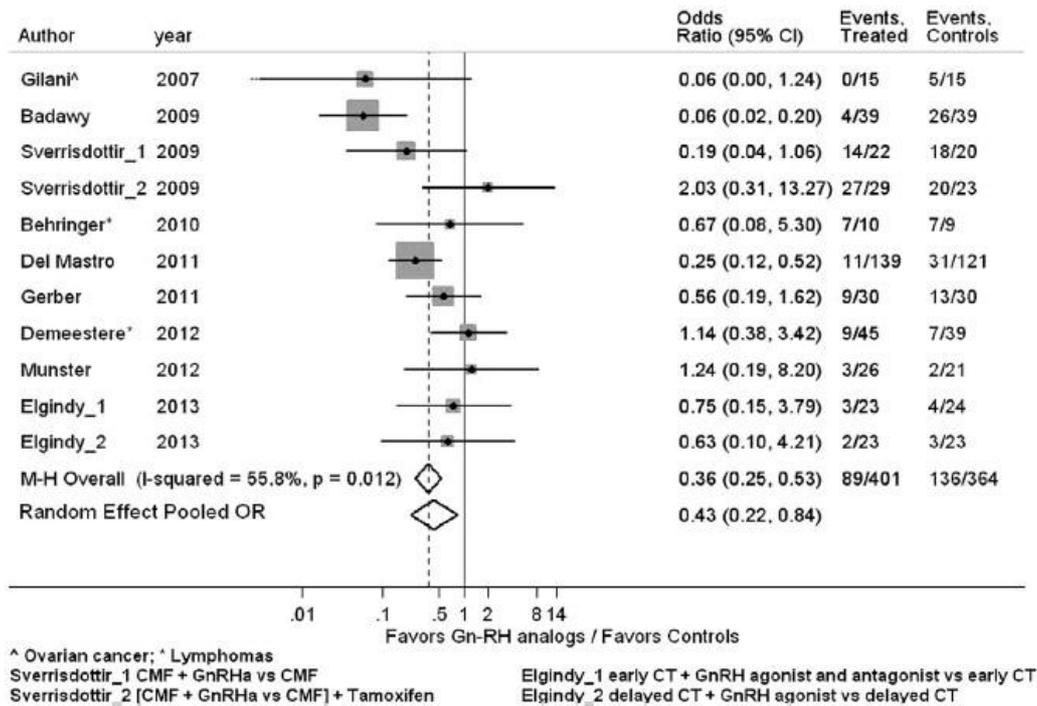


Tabella 2. Revisione sistematica e metanalisi su l'uso degli GnRH-a nella prevenzione del danno gonadico secondario alla chemioterapia (Del Mastro L *et al.*, 2014).

Il farmaco va somministrato contestualmente alla chemioterapia. Non determina elevati livelli estrogenici (se non nella fase successiva alla prima somministrazione) e non necessita né di una stimolazione ovarica né di interventi chirurgici. Quindi questo trattamento non comporta rinvii della terapia oncologica. I costi per 6 mesi di terapia sono inferiori alle procedure di stimolazione ovarica o crioconservazione ovarica.

L'impatto sulla struttura ossea non è significativo per trattamenti di durata inferiore a 6 mesi. Dunque, possono essere candidate alla terapia le pazienti di età inferiore a 45 anni desiderose di preservare la funzione ovarica.

La soppressione ovarica con analoghi durante la chemioterapia e le strategie di crioconservazione non sono tecniche mutuamente esclusive, infatti possono essere usate in maniera sinergica per aumentare le possibilità di preservazione della fertilità in donne con malattia neoplastica (Del Mastro L *et al.*, 2014).

Focus su crioconservazione degli ovociti maturi

Dal gennaio 2013 la crioconservazione ovocitaria non è definita più una tecnica sperimentale, ma è stata dichiarata dall'ASRM (American Society Reproductive Medicine) una procedura standard (ASRM, 2013). In Italia è ormai proposta e discussa come metodica ottimale di preservazione della fertilità al momento del *counseling*. Essa può rappresentare la scelta più appropriata anche in riferimento a quelle pazienti oncologiche che non hanno un partner o che, per motivi etico-religiosi, rifiutano il congelamento degli embrioni.

La metodica prevede due fasi cliniche e una fase di laboratorio:

- La prima fase è quella della stimolazione che determina crescita follicolare multipla: la procedura prevede iniezione sottocutanea giornaliera di gonadotropine alla quale deve essere associata una seconda iniezione sottocutanea. Con quest'ultima viene somministrato l'antagonista del GnRH per prevenire il picco prematuro di LH e l'ovulazione spontanea precoce. La paziente che opta per tale tipo di procedura va sottoposta a monitoraggio della crescita follicolare ogni 2-3 giorni mediante ecografia transvaginale. La durata della stimolazione può variare da 9 a 15 giorni e si devono associare dosaggi seriati di 17- β estradiolo. Il trattamento è estremamente personalizzato in quanto in base alla risposta individuale si può modificare il dosaggio delle gonadotropine. Il monitoraggio consente anche di stabilire il momento opportuno per indurre l'ovulazione e programmare il successivo prelievo eco-guidato degli ovociti (*pick-up*) che può avvenire dopo 36 ore. Sono previsti due tipi di protocolli che vengono scelti anche in base ai tempi che si hanno a disposizione prima dell'inizio del trattamento chemioterapico. Quello standard prevede che la stimolazione cominci in

corrispondenza della fase follicolare del ciclo mestruale, quindi nei giorni successivi dalla comparsa della mestruazione. Quando la paziente al momento del *counseling* non si trova nella fase adeguata del ciclo è possibile un “*random start*” ovvero l’inizio della stimolazione anche in fase luteale. Ovviamente come qualsiasi tipo di procedura può manifestare delle complicanze. In circa 1% dei cicli di riproduzione assistita si può verificare la sindrome da iperstimolazione ovarica. È una condizione temibile e da non sottovalutare in quanto può comportare eccessivo aumento del volume ovarico, versamento pelvi-peritoneale, emoconcentrazione con possibile rischio trombotico, sofferenza epatica e renale, e necessita di ricovero e terapie intensive (Justice HM *et al.*, 2008; Humaidan P *et al.*, 2010). Per prevenire questi gravi effetti collaterali bisogna scegliere adeguatamente il dosaggio delle gonadotropine ed eventualmente indurre l’ovulazione con gli agonisti del GnRH al posto della gonadotropina corionica umana (hCG – *Human chorionic gonadotropin*) (Oktay K *et al.*, 2010). In alcuni casi può essere necessario sospendere la stimolazione. La stimolazione induce iperestrogenismo e di conseguenza può essere associata ad un aumentato rischio trombotico, soprattutto in relazione al tipo di neoplasia di cui è affetta la paziente. (Somigliana *et al.*, 2014)

- La seconda fase prevede il prelievo di ovociti eco-guidato: la procedura è effettuata in *day-surgery* in anestesia generale o locale. Prevede l’introduzione di una sonda per via transvaginale alla cui estremità è montato un ago aspirante. Quest’ultimo, sempre sotto controllo ecografico, penetra attraverso la parete e arriva all’ovaio dove saranno aspirati gli ovociti. La durata è di circa 10 minuti. L’intervento è semplice con rarissime complicanze come emorragie e perforazioni di organi addominali.
- La fase di laboratorio prevede la valutazione, selezione e crioconservazione degli ovociti: in laboratorio i biologi selezionano gli

ovociti in metafase II che vengono destinati o alla vitrificazione o allo *slow freezing* (congelamento lento).

Non tutti gli ovociti saranno utilizzabili dopo lo scongelamento e ciò dipende anche dalla tecnica usata per crioconservarli. Gli embrioni si caratterizzano per una migliore conservazione e possibilità di fertilizzazione rispetto agli ovociti in seguito allo scongelamento. La prima gravidanza con tecnica *slow-freezing* è stata ottenuta nel 1986, la vitrificazione è stata applicata dal 1999 e sta sostituendo il congelamento lento in quasi tutti i laboratori. Differenti studi comparativi hanno dimostrato la maggiore validità della vitrificazione rispetto al tradizionale congelamento lento (Chen SU *et al.*, 2009; Smith GD *et al.*, 2010; Cao XY *et al.*, 2009; Patamanantham J *et al.*, 2015).

I principali fattori che influenzano i risultati del congelamento ovocitario sono l'età della paziente al momento della procedura e il numero di ovociti crioconservati. La percentuale di bambini nati per scongelamento ovocitario varia dal 12.6% al 46.4% in relazione all'età delle pazienti e al numero di ovociti vitrificati (Rienzi L *et al.*, 2012). Il tasso di malformazioni bambini nati in Italia da cicli di scongelamento ovocitario è sovrapponibile con quello della popolazione generale (Levi Setti PE *et al.*, 2014).

3. CENNI DI TERAPIA ORMONALE ADIUVANTE DEL CA DELLA MAMMELLA IN PREMENOPAUSA

La scelta del regime terapeutico dipende dal sottotipo tumorale (Luminal A, Luminal B, HER2, Basal-like) della paziente e va basata su fattori prognostici e fattori predittivi di risposta, comorbidità, preferenza della paziente e su un'attenta analisi del rapporto tra potenziale beneficio aggiuntivo ed effetti tossici.

L'ormonoterapia è indicata per le pazienti con tumori ormono-responsivi, intendendo per questi la presenza di ER-positivo $\geq 1\%$ e/o PgR-positivo $\geq 1\%$.

Non vi è indicazione, invece, nei tumori recettori ormonali negativi (ER e PgR negativo <1%). Nel caso di tumori micro-invasivi, l'eventuale prescrizione di ormonoterapia deve basarsi sulla determinazione dei recettori ormonali sulla componente invasiva (Linee Guida AIOM 2017, Neoplasie della mammella). L'obiettivo principale dell'ormonoterapia è la deprivazione completa degli estrogeni in queste pazienti. È noto, infatti, da oltre un secolo che gli estrogeni hanno un ruolo importante nello sviluppo e nella sopravvivenza delle cellule neoplastiche mammarie.

Due sono allora i possibili meccanismi su cui agire: contrastare l'interazione degli estrogeni con i loro recettori o inibire la produzione di questi ormoni, intervenendo sulla loro sintesi. Gli anti-estrogeni, come il tamoxifene e il fulvestrant, sono dotati del primo meccanismo d'azione. Gli inibitori dell'aromatasi bloccano la trasformazione degli androgeni in estrogeni, contrastando la crescita delle cellule tumorali e portandole al suicidio programmato.

Per quanto riguarda l'ormonoterapia, per molti anni la scelta del regime terapeutico è stata compiuta tenendo conto dello stato menopausale della paziente, definendo lo stato di menopausa secondo i seguenti criteri:

- annessiectomia bilaterale;
- età > 60 anni;
- età < 60 anni e amenorrea da almeno 12 mesi in assenza di chemioterapia, tamoxifene, toremifene e valori di ormone follicolo stimolante (FSH) e estradiolo nei *range* di menopausa;
- assunzione di tamoxifene o toremifene e età < 60 anni, amenorrea da almeno 12 mesi, e valori di FSH e estradiolo nei *range* di menopausa;
- non è possibile stabilire lo stato menopausale delle pazienti in trattamento con ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH).

Nelle donne in premenopausa o in perimenopausa con diagnosi di carcinoma mammario infiltrante ER- positivi e/o PgR- positivi, indipendentemente dalle

altre caratteristiche della neoplasia, la scena è stata dominata per anni dal tamoxifene, con posologia di 20 mg/os/die, per 5 anni.

Per quanto riguarda l'aggiunta al tamoxifene della soppressione ovarica (ottenibile, nella maggior parte dei casi, con GnRHa, oppure con chirurgia o con radioterapia), lo studio SOFT (*Suppression Of Ovarian Function Trial*) non ha evidenziato un vantaggio statisticamente significativo in termini di miglioramento della *Disease Free Survival* (DFS). Nella pratica clinica, tuttavia, l'aggiunta della soppressione ovarica al tamoxifene deve essere valutata in base al rischio di ripresa di malattia della singola paziente.

Tale rischio va stimato, tenendo conto delle caratteristiche della paziente (età) e del tumore (pT, pN, grado istologico, livelli di positività dei recettori ormonali, valore del Ki-67): pertanto nelle donne in premenopausa e perimenopausa con tumore HER2 negativo e recettori ormonali positivi a basso rischio di ripresa, l'aggiunta della soppressione ovarica al tamoxifene non dovrebbe essere presa in considerazione, mentre nelle donne con tumore HER2 negativo e recettori ormonali positivi ad alto rischio di ripresa, l'aggiunta della soppressione ovarica al tamoxifene dovrebbe essere considerata.

Nelle donne in postmenopausa con carcinoma mammario infiltrante operato ER-positivi e/o PgR-positivi, invece, dovrebbe essere valutata l'ormonoterapia adiuvante con inibitori steroidei dell'aromatasi (anastrozolo, letrozolo, exemestane), preso atto del vantaggio in DFS evidenziato dai vari studi clinici randomizzati di fase III. Questi farmaci rappresentano, in questa fase, il trattamento endocrino di riferimento. Essi vanno somministrati in sostituzione del tamoxifene (per 5 anni) o in sequenza (per 2-3 anni) dopo 3-2 anni di tamoxifene. In questo modo la durata complessiva della terapia endocrina sarà sempre pari a 5 anni.

Il tamoxifene, tuttavia, continua ad essere un'alternativa agli inibitori steroidei dell'aromatasi nelle pazienti che rifiutano questo trattamento o in coloro che sviluppano gravi tossicità, come ad esempio quella a carico dell'apparato muscolo scheletrico.

Nelle donne che durante la chemioterapia o il trattamento con tamoxifene sono andate in menopausa, è indicato l'uso del letrozolo, dopo i 5 anni di tamoxifene. Tale strategia ha, infatti, dimostrato benefici superiori in termini di DFS e *overall survival* (OS), rispetto a quanto riportato nelle pazienti già in postmenopausa al momento della diagnosi, come rilevato dall'analisi per sottogruppi non pianificata dello studio MA-17 (Goss PE *et al.* 2008).

Una piccola parentesi merita il trattamento adiuvante del tumore metastatico. In questo caso, nelle donne in premenopausa l'opzione terapeutica più adeguata sembra essere il tamoxifene in aggiunta alla soppressione ovarica mediante analoghi del GnRH. Nelle donne in post-menopausa, invece, ancora una volta la scelta ricade sugli inibitori dell'aromatasi di III generazione. Inoltre, nelle pazienti resistenti agli inibitori dell'aromatasi, vi è la possibilità di intraprendere un trattamento con exemestane associato ad everolimus (farmaco a bersaglio molecolare inibitore di m-TOR) oppure si può optare per il fulvestrant, un farmaco che agisce bloccando ed eliminando il recettore degli estrogeni. Infine, come opzione palliativa possono essere somministrati progestinici (medrossi-progesterone acetato o megestrolo acetato).

Nuove strategie terapeutiche adiuvanti in età riproduttiva

L'analisi combinata degli studi SOFT e TEXT (*Tamoxifen and Exemestane Trial*) (Jurg Bernhard *et al.*, 2015) afferma per la prima volta un possibile ruolo di un inibitore dell'aromatasi nel trattamento adiuvante di donne in premenopausa con carcinoma mammario endocrino responsivo. In entrambi gli studi, l'*endpoint* primario è la sopravvivenza libera da malattia (DFS), intesa come il tempo intercorso tra la randomizzazione e la comparsa di: recidiva del tumore (locale o a distanza), comparsa in sede controlaterale di carcinoma mammario, insorgenza di una nuova neoplasia (non carcinoma della mammella)

oppure morte non causata da recidiva o da nuova neoplasia invasiva. Tra gli endpoints secondari viene considerata la *Overall Survival*, intesa come il tempo intercorso tra la randomizzazione e la morte per qualunque causa.

Lo studio randomizzato di fase III SOFT è stato condotto su 3066 donne in stato pre-menopausale con diagnosi di carcinoma mammario endocrino responsivo, stratificate in base a se siano state sottoposte o no a chemioterapia pregressa (adiuvante o neo-adiuvante), allo stato dei linfonodi (positivo o negativo) e in base a se siano state destinate o meno alla OFS. Sono stati considerati tre gruppi di studio: il primo trattato con solo tamoxifene (20 mg/ die), il secondo con tamoxifene + *Ovarian Function Suppression* (OFS) e infine il terzo gruppo in trattamento con exemestane (25mg/die per os) + OFS, per 5 anni. La soppressione della funzione ovarica è stata ottenuta mediante l'impiego di uno dei seguenti approcci: GnRH analogo (triptorelina) ogni 28 giorni, ooforectomia, irradiazione delle ovaie. (**Figura 2**)



Figura 2. SOFT design

L'obiettivo dello studio è: comprendere quale sia l'effettivo ruolo della soppressione ovarica in corso di ormonoterapia adiuvante e se vi sia la possibilità di utilizzare gli AI in associazione all'OFS anche in pazienti in premenopausa.

Ad un follow-up mediano di 67 mesi, il tasso di *disease-free survival* a 5 anni è risultato: 86.6% nel braccio "tamoxifene/soppressione ovarica" e 84.7% nel braccio con il solo tamoxifene (*hazard ratio* 0.83; 95% IC 0.66-1.04; P=0.10)

(Tabella 3). Nella coorte di pazienti che avevano ricevuto la chemioterapia (espressione di un rischio basale di recidiva più elevato), il tasso di *disease-free survival* a 5 anni è risultato dell'82.5% nel braccio "tamoxifene/soppressione ovarica" e del 78.0% nel braccio con il solo tamoxifene (HR 0.78; 95% IC 0.60-1.02). Inoltre, il tasso di *disease-free survival* a 5 anni con la soppressione ovarica + exemestane è risultato dell'85.7% (*hazard ratio* vs tamoxifene, 0.65; 95% IC 0.49-0.87). In altri termini, la recidiva si è ripresentata in una donna su tre fra le pazienti che avevano ricevuto la monoterapia con tamoxifene e in una donna su sei tra coloro che avevano ricevuto soppressione ovarica + exemestane. Il sottogruppo che ha tratto minor beneficio dalla soppressione ovarica è risultato quello delle donne che non avevano ricevuto la chemioterapia (selezione clinica per rischio di recidiva stimato basso).

SOFT	Tamoxifen-OFS	Tamoxifen	P value
5-yr DFS	86.6%	84.7%	0.10
5-yr OS	96.7%	95.1%	0.13
5-yr BC freedom rate	88.4%	86.4%	0.09

Tabella 3 Risultati studio SOFT (Linee guida AIOM 2017)

Lo studio SOFT fornisce alcuni messaggi essenziali per il trattamento di donne in stato premenopausale con carcinoma mammario ER e/o PgR positivo:

- Donne in premenopausa ma di età superiore a 35 anni, che non hanno ricevuto la chemioterapia, a basso rischio, usualmente con tumori piccoli, di basso grado e con stato linfonodale negativo possono essere ragionevolmente trattate con il solo tamoxifene.
- Nelle situazioni a maggior rischio, specie in pazienti di età inferiore a 35 anni, la soppressione ovarica ha un valore aggiunto nel ridurre il rischio di recidiva.

- Il beneficio maggiore si ottiene combinando la soppressione ovarica con l'exemestane.
- Alle donne a rischio intermedio, a seconda dei casi, può essere proposto il solo tamoxifene o un trattamento combinato (soppressione ovarica + tamoxifene o exemestane).

Nello studio di fase III TEXT invece il mirino si sposta ancor più nello specifico sul ruolo degli inibitori dell'aromatasi in premenopausa. Lo studio mette a confronto due popolazioni: una in trattamento con tamoxifene (20mg/die) + OFS (triptorelina 3,75 intramuscolare ogni 28 giorni) e la seconda in trattamento con exemestane (25mg/die per os) + OFS (triptorelina i.m 3,75mg ogni 28 giorni). La chemioterapia è facoltativa nello studio TEXT, e se somministrata è contemporanea alla triptorelina. La terapia endocrina orale viene iniziata, invece, dopo aver completato la chemioterapia, oppure dopo 6-8 settimane dalla somministrazione di triptorelina nelle donne che non sono state sottoposte a terapia antitumorale.

La stratificazione della popolazione oggetto di studio è stata fatta tenendo conto dello stato linfonodale (positivo o negativo) e dell'impiego o meno della chemioterapia adiuvante. (**Figura 3**)

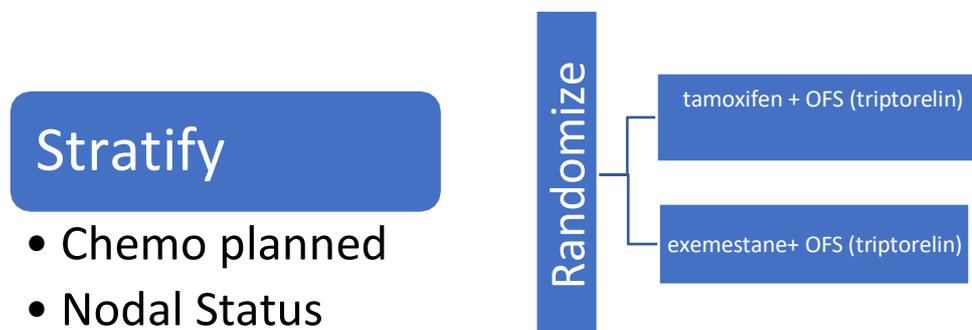


Figura 3. TEXT design

I risultati ottenuti dall'analisi combinata degli studi SOFT e TEXT sono nettamente a favore dell'exemestane con una sopravvivenza a 5 anni senza malattia del 91,1% rispetto all'87,3% dell'altro gruppo. Inoltre, nelle pazienti che hanno ricevuto E+OFS sono state osservate una riduzione del rischio di recidiva mammaria e una riduzione del rischio di recidiva a distanza. Nessuna differenza significativa è emersa in termini di *Over Survive* (OS) tra i due trattamenti (OS a 5 anni in E+OFS vs E+OFS: 95.9% vs 96.9%) (**Tabella 4**).

TEXT-SOFT combined analysis	Tamoxifen-OFS	Exemestane-OFS	P-value
5-yr DFS	87.3%	91.1%	P<0.001
5-yr BC free interval	88.8%	92.8%	P<0.001
Freedom from recurrence of breast cancer at a distant site	92%	93.8%	P=0.02
5-yr OS	95.9%	96.9%	p=0.37
5-yr OS > 95% in both groups, not significantly different according to assignment, but not considered mature			
Selected adverse events of Grade 3 or 4	29.4%	30.6%	

Tabella 4 Risultati dall'analisi combinata degli studi SOFT e TEXT (Linee guida AIOM 2017)

Pertanto, nelle donne in premenopausa con carcinoma mammario potenzialmente endocrinosensibile, la combinazione di soppressione della funzione ovarica e inibitore dell'aromatasi (exemestane) rappresenta una nuova opzione terapeutica nel *setting* adiuvante. La dimostrazione di un vantaggio assoluto del 4% rispetto al trattamento con soppressione ovarica e tamoxifene, riflette una riduzione in eventi locali, locoregionali, controlaterali e a distanza. In termini di soppressione ormonale, exemestane più GnRH-analogo ha mostrato livelli di estradiolo (E2) inferiori alla soglia definita di 2,72 pg/ mL, per almeno 12 mesi nella maggior parte delle pazienti, risultando significativamente inferiore al confronto con tamoxifene più triptorelina.

Tuttavia, a 3, 6 e 12 mesi, il 25%, il 24% e il 17% rispettivamente avevano un livello E2 superiore alla soglia (Bellet M *et al.* SOFT-EST Substudy).

Nonostante ciò, alcuni autori hanno sollevato dubbi circa il vantaggio sull'uso di inibitori dell'aromatasi in premenopausa. In particolare, anche se è stato segnalato un miglioramento nella sopravvivenza libera da malattia, nessuna differenza significativa è emersa in termini di Over Survive.

In tal senso, lo studio austriaco ABSCG-12 ha riportato un aumento della sopravvivenza globale con soppressione ovarica più tamoxifene rispetto a soppressione ovarica più inibitore dell'aromatasi (HR 1,63, IC 95% 1,05-2,52). Lo studio ABSCG-12 multicentrico è stato condotto su 1.803 donne in premenopausa con carcinoma mammario ormonoresponsivo in stadio precoce (stadio I-II) che hanno ricevuto goserelin (3,6 mg ogni 28 giorni) e sono state randomizzate in quattro bracci di studio: tamoxifene (20 mg /die) o anastrozolo (1 mg /die), con o senza acido zoledronico, ZOL (4 mg ogni 6 mesi) per 3 anni. Ad un follow-up mediano di 62 mesi, più di 2 anni dopo il completamento del trattamento, sono stati riportati 186 casi liberi da malattia (53 casi in 450 pazienti trattate con tamoxifene da solo, 57 in 453 pazienti con anastrozolo da solo, 36 in 450 pazienti trattate con Tamoxifene più acido zoledronico, e 40 nei 450 pazienti trattati con anastrozolo più acido zoledronico).

Non c'era differenza nella sopravvivenza libera da malattia tra le pazienti in tamoxifene da solo contro anastrozolo solo (HR 1.08, 95% CI 0,81-1,44; p = 0,591), ma la sopravvivenza globale era peggiore tra coloro che erano state trattate con anastrozolo rispetto a tamoxifene (46 vs 27 decessi; HR 1,75, 95% CI 1,08-2,83; p = 0,02). Lo studio ha anche dimostrato che l'aggiunta di acido zoledronico alla terapia adiuvante endocrina migliora significativamente la sopravvivenza libera da malattia (Gnant M. *et al.*, 2015).

Le differenze tra i risultati degli studi possono essere attribuite ad una maggiore potenza statistica dell'analisi combinata degli studi TEXT e SOFT rispetto allo studio austriaco e alla diversa durata dei trattamenti (AIOM 2017).

Combinando i risultati degli studi ABCSG-12, SOFT e TEXT, sono stati riportati 65 eventi DFS in meno (350 eventi in 3246 donne contro 415 eventi in 3247 donne, rispettivamente, HR 0,89, IC 95% 0,57-1,39, P = 0,62, S2 = 0,09, eterogeneità P<0,01) ma 30 decessi in più per soppressione ovarica più inibitore dell'aromatasi rispetto a soppressione ovarica più tamoxifene (155 morti in 3249 donne vs 125 morti in 3244 donne, rispettivamente, HR 1,31, IC 95% 0,93-1,84, P = 0,12, S2 = 0,03, eterogeneità P = 0,18). Si riscontra pertanto una discordanza tra DFS e OS dato che ci si aspetterebbe meno morti nel gruppo con meno eventi di sopravvivenza libera da malattia. Maggiore concordanza emerge dall'analisi combinata degli studi SOFT ed E-3193 (Tevaarwerk AJ et al.): 24 eventi DFS in meno (160 eventi in 1185 donne contro 184 eventi in 1185 donne, rispettivamente, HR 0,83, 95% CI 0,67-1,03, P = 0,09, s 2 = 0, eterogeneità P = 0,94) e 14 decessi in meno (58 morti in 1185 donne contro 72 morti in 1185 donne, rispettivamente, HR 0,76, 95% CI 0,53-1,07, P = 0,12, S2 = 0, eterogeneità P = 0,78) in caso di soppressione ovarica più tamoxifene rispetto al solo tamoxifene. **(Tabella 5)**

L'apparente discordanza tra sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale con soppressione ovarica più inibitore dell'aromatasi può trovare ragione nell' incompleta e/o intermittente soppressione degli estrogeni con gli analoghi del GnRH come visto nello studio SOFT-EST. Un altro aspetto interessante emerso durante lo studio ABCSG-12 è che sembra esserci un maggior rischio di morte e di recidiva della malattia nelle donne in sovrappeso trattate con anastrozolo+OFS, rispetto alle pazienti con BMI nella norma. Tale differenza non è stata riscontrata tra le donne trattate con tamoxifene + OFS. Anche in questo caso, il motivo potrebbe risiedere in una incompleta soppressione dell'ovaio oppure in una maggiore attività dell'aromatasi, che si traduce in livelli di estrogeni più alti nelle pazienti obese o sovrappeso e dunque in un maggior rischio di recidiva.

Pertanto, la metanalisi suggerisce che è prematuro raccomandare l'uso routinario della soppressione ovarica più inibitore dell'aromatasi come terapia

adiuvante in donne in premenopausa con diagnosi di carcinoma mammario positivo ai recettori ormonali (Chlebowski RT et al., 2016).

Trial/ Analysis	N	Patient Population	Treatment	Duration of Treatment	Median Follow-Up	5-yr DFS	5-yr OS
ABCSG-12[22]	1,803	6% received chemotherapy 30% node-positive	OFS + tamoxifen vs OFS + anastrozole	3 yrs	7.9 yrs	117 vs 134 events HR: 1.13 95% CI: 0.88–1.45 P = .335	33 vs 53 events HR: 1.63 95% CI: 1.05–2.52 P = .03
SOFT primary analysis[17]	2,033	53% received chemotherapy 35% node-positive	Tamoxifen vs OFS + tamoxifen	5 yrs	5.6 yrs	84.7% vs 86.6% HR: 0.83 95% CI: 0.66–1.04	90.9% vs 94.5% ^a HR: 0.64 95% CI: 0.42–0.96
SOFT/TEXT combined analysis[18]	4,690	57% received chemotherapy 42% node-positive	OFS + tamoxifen vs OFS + exemestane	5 yrs	5.7 yrs	87.3% vs 91.1% HR: 0.72 95% CI: 0.6–0.85 P < .001	96.9% vs 95.9% HR: 1.14 95% CI: 0.86–1.51 P = .37

^aChemotherapy cohort only.

ABCSG = Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group; CI = confidence interval; DFS = disease-free survival; HR = hazard ratio; OFS = ovarian function suppression; OS = overall survival; SOFT = Suppression of Ovarian Function Trial; TEXT = Tamoxifen and Exemestane Trial.

Tabella 5. Studi ABCSG-12, SOFT e TEXT a confronto

3.1 Modulatore selettivo del recettore degli estrogeni (SERMS): Tamoxifene

Il tamoxifene è il modulatore selettivo del recettore degli estrogeni maggiormente impiegato nella pratica clinica, in particolare nel tumore alla mammella. Come già affermato precedentemente, quest'ultimo ha un ruolo fondamentale nel trattamento delle pazienti in premenopausa o perimenopausa con diagnosi di carcinoma mammario infiltrante operato ER-positivo e/o PgR-positivo. In postmenopausa, il tamoxifene può essere utilizzato per 2-3 anni seguito dagli inibitori dell'aromatasi per 3-2 anni o in alternative a questi ultimi per 5 anni nelle pazienti che rifiutano gli antiaromatasi e per le pazienti per le quali è controindicato l'uso degli antiaromatasi o che sviluppano tossicità gravi.

Dal punto di vista farmacocinetico questo farmaco viene metabolizzato dal sistema enzimatico del citocromo P450 con liberazione dei metaboliti attivi. La forma attiva del farmaco, endoxifene, inibisce gli effetti degli estrogeni,

competendo con essi per il sito di legame sui recettori specifici, per il quale presenta elevata affinità. Una volta legato al recettore, il tamoxifene ne induce cambiamenti conformazionali e dimerizzazione, dando luogo ad un complesso ER-tamoxifene incapace di reclutare i coattivatori necessari per l'attivazione trascrizionale (**Figura 4**).

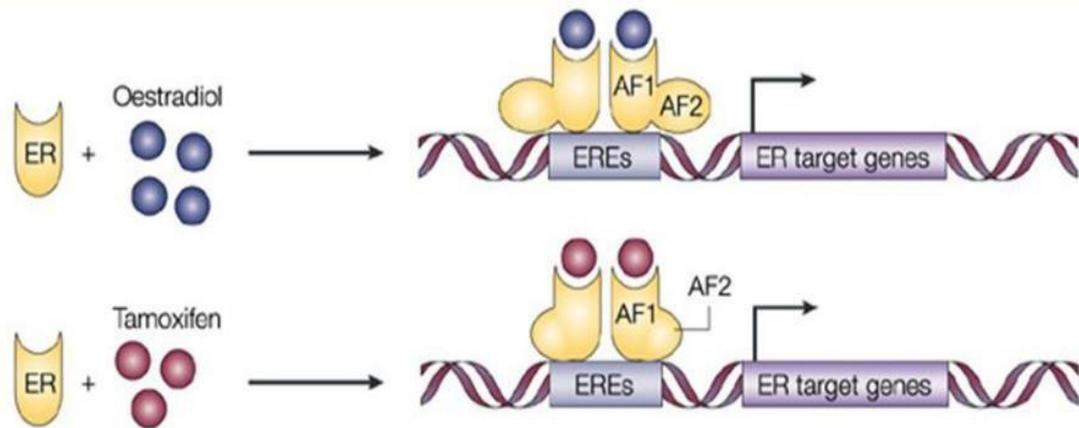


Figura 4. Meccanismo d'azione del Tamoxifene.

Come tutti i SERMS, il tamoxifene dimostra effetti simil-estrogenici e anti-estrogenici in funzione del contesto cellulare dove si viene a trovare: a livello mammario impedisce l'interazione tra l'estrogeno e il suo recettore, a livello dell'endometrio svolge un effetto simil-estrogenico con aumento dell'incidenza di iperplasia endometriale, polipi, cisti e fibromi uterini. Diversi studi hanno, inoltre, dimostrato la riduzione dei livelli di colesterolo totale e di lipoproteine a bassa densità a livello ematico, oltre che il mantenimento della densità minerale ossea, espressione della sua azione estrogenica.

Nelle donne con tumore recettore-positivo, il tamoxifene riduce significativamente il rischio annuale di recidive del 39% e di morte per tumore della mammella del 30% rispetto al controllo, indipendentemente dallo stato menopausale, dall'età, dalla precedente chemioterapia, dallo stato linfonodale e dallo stato del recettore del progesterone. Ad un follow-up a 15 anni, il

trattamento con tamoxifene per 5 anni riduce il rischio di recidive e di morte del 13,2% e del 9,2%, rispettivamente (EBCTCG *et al.*, 2011).

3.2 Inibitori dell'aromatasi

Gli inibitori dell'aromatasi bloccano la sintesi degli estrogeni inibendo o inattivando l'aromatasi, l'enzima responsabile della sintesi degli estrogeni a partire da precursori androgenici: l'androstenedione per la sintesi dell'estrone e il testosterone per quella dell'estradiolo (**Figura 5**). L'aromatasi è un enzima che appartiene alla superfamiglia del citocromo P-450 in quanto prodotto dal gene CYP19; è altamente espresso nelle cellule granulose dei follicoli ovarici, sotto lo stimolo dell'FSH ipofisario e nella placenta. L'aromatasi è anche presente, a livelli più bassi, nel tessuto adiposo, fegato, muscolo, cervello e nella ghiandola mammaria (sia normale che tumorale).

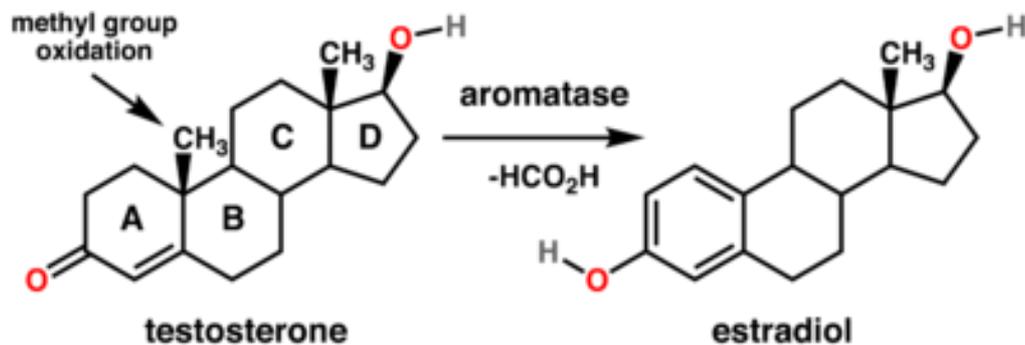


Figura 5 Meccanismo d'azione degli inibitori dell'aromatasi al livello molecolare.

La produzione di estrogeni nelle donne in postmenopausa è da ascrivere quasi completamente all'azione delle aromatasi periferiche, responsabili dell'aromatizzazione degli androgeni ovarici e surrenalici in estrogeni a livello dei tessuti periferici. Un ruolo determinante è svolto in questo senso dalle aromatasi del tessuto adiposo: esiste infatti una relazione diretta tra BMI (*body-mass index*) e livelli ematici di estrogeni in donne in post-menopausa.

All'inizio della menopausa, la quota estrogenica scende da valori di circa 110pg/ml a valori al di sotto di 10pg/ml, quindi molto più bassi ma stabili nel tempo. Tuttavia, in caso di tumore mammario, la concentrazione di estradiolo presente nel tessuto tumorale è di circa 10 volte maggiore di quella presente in circolo, probabilmente come conseguenza dell'attività aromatasica intratumorale (Thijssen JH *et al.* 1989).

A più di cento anni fa risale la prima osservazione che l'ovariectomia bilaterale (e dunque la deprivazione estrogenica) è in grado di determinare la regressione di carcinomi mammari in fase avanzata in donne in premenopausa. Dunque, il ruolo degli estrogeni nella genesi e nello sviluppo del carcinoma mammario (in particolare nelle forme positive all'espressione recettoriale) è noto da oltre un secolo.

Da tali considerazioni deriva la scelta terapeutica degli inibitori dell'aromatasi in corso di terapia ormonale adiuvante in pazienti con carcinoma della mammella ormonoresponsivo.

L'**aminoglutetimide** è stato il primo inibitore dell'aromatasi utilizzato in terapia. Inizialmente nato come anticonvulsione, fu presto abbandonato perché responsabile di insufficienza surrenalica. Successivamente fu dimostrata la sua capacità di inibire diversi enzimi della famiglia del citocromo P450 coinvolti nella steroidogenesi e su questa base si propose il suo impiego nella terapia del carcinoma mammario, per indurre surrenectomia farmacologica. Gli effetti collaterali hanno limitato il suo utilizzo, ma l'osservazione che la sua efficacia era principalmente dovuta all'inibizione dell'attività aromatasica ha stimolato lo sviluppo di nuovi composti dotati di maggiore selettività.

Gli inibitori dell'aromatasi sono attualmente distinti in farmaci di 1°, 2° e 3° generazione, secondo l'ordine cronologico del loro sviluppo clinico, e in composti di tipo 1 e di tipo 2, sulla base del meccanismo d'azione.

Gli inibitori di tipo 1 (o inattivatori enzimatici steroidei) sono analoghi strutturali dell'androstenedione e si legano irreversibilmente al medesimo sito

della molecola dell'aromatasi. Gli inibitori di tipo 2 (o inibitori enzimatici non steroidei), invece, legano reversibilmente il gruppo eme dell'enzima aromatasi. L'aminoglutetimide rappresenta la 1° generazione di inibitori dell'aromatasi. I composti di 2° generazione sono il **fadrozolo**, composto di tipo 2, e il **formestano**, un composto appartenente agli inibitori di tipo 1, dotato di buona efficacia clinica, il cui limite è rappresentato principalmente dalla via di somministrazione (iniezione intramuscolare). La 3° generazione comprende **anastrozolo** (*Arimidex*) e **letrozolo** (*Femara*), composti triazolici, e l'**exemestane** (*Aromasin*), a struttura steroidea. Il letrozolo è stato utilizzato come agente di induzione dell'ovulazione nelle donne subfertili con sindrome ovarica policistica ovarica (PCOS) generando tassi di gravidanza migliori rispetto al clomifene citrato (CC) (Amer SA *et al.*, 2017).

Inibitori dell'aromatasi di 3° generazione: exemestane

Gli inibitori dell'aromatasi di 3° generazione sono oggi i più utilizzati in clinica. Essi non influenzano in modo significativo la steroidogenesi surrenalica (non modificano, quindi, i livelli basali di cortisolo ed aldosterone) e hanno il vantaggio di poter essere somministrati per via orale una sola volta al giorno. Gli inibitori dell'aromatasi di terza generazione hanno dimostrato negli studi preclinici una potenza superiore di tre ordini di grandezza rispetto a quella dell'aminoglutetimide, associata ad una buona tollerabilità. L'anastrozolo e il letrozolo sono inibitori dell'aromatasi di tipo 2 e hanno una emivita plasmatica di circa 48 ore. L'exemestane è invece un inibitore dell'aromatasi di tipo 1 (inattivatore steroideo). La sua emivita plasmatica è di 27 ore. Rispetto agli inibitori precedentemente studiati, l'exemestane ha dimostrato un'affinità 10 volte maggiore per l'enzima e un'inattivazione più veloce (Lombardi, 2002). Nel corso di studi preclinici in pazienti in post menopausa con tumore mammario in stadio avanzato, l'exemestane, a dosi ripetute giornaliere da 5 a 600 mg, ha provocato inibizione massima (>90%) degli estrogeni nel plasma a partire da dosi inferiori, dimostrando una risposta positiva fino al 33% delle

pazienti valutabili (Lonning, 1997). La dose minima efficace di exemestane nei pazienti affetti da cancro al seno è stata valutata a 0,5 mg / die, ottenendo una soppressione dell'estrogeno di circa il 25-30% rispetto alla linea di base a partire dal giorno 7 del trattamento. Gli effetti più favorevoli, come la soppressione massima degli estrogeni, la tollerabilità e l'attività antitumorale, sono stati osservati a 25 mg di somministrazione orale giornaliera, con un grado di inattivazione enzimatica pari al 98% (Evans TRJ *et al.*, 1992; Johannessen DC *et al.*, 1997; Paridaens R. *et al.*, 1998).

Per molti anni gli inibitori dell'aromatasi e in particolare l'exemestane hanno occupato, quindi, un posto importantissimo nel trattamento unicamente delle donne in postmenopausa in relazione alla loro prevalente azione sulla quota estrogenica periferica. Una possibile spiegazione allo scetticismo scientifico riguardo l'utilizzo di questi ultimi in premenopausa, può essere correlato all'ipotesi di un incremento dell'attività ipofisaria e ipotalamica, a causa della soppressione del feed-back negativo periferico, con conseguenze dannose a carico delle ovaie (Sinha S *et al.*, 1998). In altre parole, in premenopausa gli IA non sono in grado di sopprimere adeguatamente la sintesi ovarica di estrogeni e ciò può associarsi allo sviluppo di patologia ovarica benigna.

In realtà, l'analisi combinata degli studi TEXT e SOFT, già precedentemente citati, per la prima volta dimostra un'evidente superiorità in termini di sopravvivenza libera da malattia grazie al trattamento con exemestane in associazione alla soppressione dell'attività ovarica con analoghi del GnRH, rispetto al trattamento con tamoxifene (DFS a 5 anni è stata pari al 91.1% vs 87.3%, rispettivamente) (Regan MM. *et al.*, 2016).

3.3 Agonisti di GnRH nella terapia adiuvante

Nelle pazienti in premenopausa con carcinoma mammario in fase iniziale, l'aggiunta di un GnRH agonista alla chemioterapia adiuvante abbiamo visto avere un ruolo di protezione gonadica ed è associata ad un'eccellente

sopravvivenza libera da malattia e da un incremento dei tassi di sopravvivenza globale (Recchia F. *et al.*, 2014).

Per quanto riguarda i dati scientifici relativi all'aggiunta dell'analogo al tamoxifene, sembra che questa apporti un marginale beneficio in termini di recidiva e di morte. Nello studio SOFT, hot flushes, sudorazione, calo della libido, secchezza vaginale, sintomi muscolo-scheletrici, ipertensione e intolleranza al glucosio sono stati riportati più frequentemente nel gruppo Tamoxifene+OFS rispetto al gruppo trattato con solo tamoxifene. Nonostante ciò, è importante sottolineare come l'utilizzo di tale combinazione consenta di evitare l'aumento dei livelli di estradiolo plasmatici che si può verificare con il solo tamoxifene (aspetto favorevole in corso di trattamento in premenopausa). Alla luce di quanto osservato, le raccomandazioni cliniche riportate nelle linee guida per il trattamento del carcinoma mammario AIOM 2017, indicano che: l'aggiunta della soppressione ovarica mediante analoghi del GnRH al tamoxifene dovrebbe essere presa in considerazione solo in donne con carcinoma mammario ormono-responsivo, operate, HER2 negative ad ALTO rischio.

Come già precedentemente riportato, dall'analisi combinata degli studi SOFT e TEXT (Pagani *et al.* 2016) è emerso che exemestane+OFS rappresenta una valida alternativa terapeutica nelle pazienti con carcinoma della mammella ormonoresponsivo in premenopausa. Tuttavia, quando si utilizza questa scelta terapeutica in donne molto giovani, può accadere che la funzionalità ovarica non venga adeguatamente soppressa. Nello studio SOFT EST è stato osservato un aumento inatteso dei livelli sierici di estrogeni e ciò suggerisce la necessità di un monitoraggio per escludere una potenziale attività stimolatoria degli inibitori steroidei dell'aromatasi sull'ovaio in premenopausa.

4 TERAPIE ADIUVANTI ORMONALI: ASPETTI ENDOCRINO-GINECOLOGICI

Le pazienti in corso di terapia ormonale per carcinoma mammario devono necessariamente essere sottoposte ad un attento *follow-up* endocrino-ginecologico al fine di monitorare i possibili effetti avversi indotti dall'utilizzo di farmaci che agiscono sull'assetto ormonale.

Qui di seguito verranno descritti nel dettaglio i principali effetti legati all'utilizzo dei farmaci cardine nel trattamento ormonale adiuvante del tumore mammario: tamoxifene, inibitori steroidei dell'aromatasi con particolare riferimento all'exemestane e analoghi del GnRH. Tamoxifene ed exemestane hanno profili di tossicità differenti e la discussione riguardo agli effetti collaterali potenziali deve far parte del processo decisionale da condividere con la paziente. In termini di qualità di vita, gli studi TEXT e SOFT non hanno fornito alcuna indicazione forte per preferire il regime exemestane + OFS rispetto al regime tamoxifene + OFS nel trattamento adiuvante del carcinoma mammario in premenopausa. Le due modalità terapeutiche si caratterizzano per effetti endocrini distinti il cui peso merita di essere discusso individualmente con le pazienti.

Effetti avversi del tamoxifene

In quanto inibitore selettivo del recettore degli estrogeni è noto come il tamoxifene abbia un ruolo antiestrogenico al livello mammario ma funga da agonista del recettore degli estrogeni al livello dell'endometrio uterino. Il tamoxifene infatti è associato ad un notevole aumento dell'incidenza di iperplasia endometriale, polipi, cisti e fibromi uterini (Neven P. *et al.*, 1998), oltre che un incremento del rischio di sarcoma e carcinoma uterino, quest'ultimo in particolare sembra dipendere anche dalla durata della terapia e dalla dose cumulativa (F.E. van Leeuwen *et al.*, 1994). Tuttavia, questo rischio deve

essere valutato rispetto ai benefici derivanti dal trattamento, che per la maggior parte delle pazienti sono di gran lunga superiori ai rischi.

Pertanto, le pazienti oncologiche sono sottoposte a controlli ginecologici periodici che prevedono la valutazione dello spessore della rima endometriale allo scopo di individuare precocemente eventuali anomalie suggestive di carcinoma endometriale.

Se in uno stato di post-menopausa uno spessore della rima endometriale <5 mm può essere considerato un valido *cut-off* per escludere eventuali patologie (Smith-Bindman *et al.* 1998), è stato riportato in alcuni studi come l'endometrio delle pazienti sotto tamoxifene sia >5 mm nel 85 % dei casi (Salazar ER *et al.* 2005). Da qui nasce l'esigenza di valutare ecograficamente le pazienti con una periodicità non superiore a 6 mesi/1 anno.

In termini di effetti collaterali, dall'analisi combinata degli studi SOFT e TEXT è emerso come il trattamento con tamoxifene + OFS ha generato più *hot flushes* e sudorazione durante il periodo di 5 anni rispetto al trattamento con exemestane + OFS, sebbene sia stato osservato un miglioramento progressivo di tali sintomi; è stata poi osservata una maggiore incidenza di eventi tromboembolici, artromialgie, osteoporosi, fratture ossee, incontinenza urinaria e sintomi menopausali (secchezza vaginale, vampate di calore, perdita della libido, dispareunia).

Da non trascurare dal punto di vista ginecologico inoltre la possibilità di insorgenza di disturbi mestruali, amenorrea, prurito vulvare, perdite vaginali e cisti ovariche.

Effetti avversi dell'exemestane

Per quanto concerne invece gli effetti collaterali legati all'utilizzo dell'exemestane è importante prima di tutto sottolineare come, in tutti gli studi clinici condotti, il farmaco al dosaggio di 25 mg/die è stato generalmente ben tollerato.

Le reazioni avverse più comunemente riportate sono state vampate di calore, presenti in circa il 50% dei casi (Shanafelt *et al.* 2002) nausea e vomito, osteopenia ed osteoporosi.

L'effetto sull'osso di questi farmaci è di facile comprensione dato l'abbattimento della carica estrogenica, infatti il tasso di *turnover* dell'osso, il decremento della densità minerale ossea (BMD) e l'incidenza di fratture aumentano nelle pazienti in terapia con inibitori dell'aromatasi come suggerito negli studi ATAC, BIG 1-98 e l'IES (Coleman RE *et al.*, 2010, Eastell R. *et al.*, 2011, Zaman K. *et al.*, 2012).

Non esistono dati statistici significativi al riguardo, ma nella pratica clinica più della metà delle pazienti lamenta sintomatologia muscolo-scheletrica (Presant CA *et al.*, 2007, Lintermans A. *et al.* 2011), nella maggior parte dei casi i sintomi compaiono presto rispetto all'inizio della terapia, entro 3 mesi di trattamento e rischiano, data la compromissione della qualità della vita, di ridurre l'adesione terapeutica della paziente.

Dal punto di vista strettamente ginecologico lo studio TEAM ha infine confrontato i tipici sintomi della menopausa dopo il primo anno di trattamento con exemestane rispetto al trattamento con tamoxifene (Jones *et al.*, 2007). Non ci sono evidenti differenze, secondo questo studio, per quanto riguarda sanguinamenti vaginali persistenti, ma le pazienti in trattamento con AI lamentano maggiore secchezza vaginale, perdita dell'interesse sessuale e difficoltà nel raggiungere l'eccitazione.

Il trattamento con Inibitori dell'Aromatasi è stato associato anche ad un incremento della dispareunia rispetto ai soggetti che seguono altro tipo di terapia (Wiggins DL & Dizon DS *et al.*, 2008, Mortimer JE *et al.*, 2010)

Effetti avversi degli analoghi del GnRH

Uno degli effetti collaterali più comuni, conseguente all'uso prolungato dei GnRHa, è il severo ipoestrogenismo secondario, che può portare a sintomi quali

diminuzione della libido, cefalea, turbe mestruali, secchezza vaginale e fenomeni vasomotori (vampate di calore), caratteristici dello stato menopausale. L'uso prolungato di questi farmaci può, altresì, causare una riduzione del contenuto minerale osseo, tanto da rendere necessario follow up periodico ed eventuale trattamento sostitutivo.

Nelle donne in trattamento con analoghi agonisti si induce uno stato di amenorrea ipogonadotropica. Il sopraggiungere di metrorragia o spotting dopo il primo mese di trattamento è da considerarsi anormale e in tal caso suggerisce il controllo del livello di E2 plasmatico. Se quest'ultimo risulta essere inferiore a 50 pg/ml è necessario ricercare eventuali lesioni organiche associate (Tan S-H. Wolff A.C 2007)

Il ruolo del ginecologo nel follow up

In corso di terapia ormonale adiuvante, come sottolineato più volte precedentemente, è fondamentale sottoporre le pazienti a controlli ginecologici periodici durante i quali assume particolare importanza il monitoraggio, la gestione degli effetti collaterali della terapia e la sorveglianza per il rischio aumentato di secondi tumori ginecologici. Pertanto, è consigliabile eseguire in tutte le donne una visita, ecografia ginecologica e pap test regolarmente.

In particolare, nelle pazienti sottoposte a trattamento antiormonale quinquennale con AI dovrebbero essere indagati i livelli basali di FSH, LH, estradiolo. Nelle pazienti in post menopausa o in premenopausa con fattori di rischio per l'osteoporosi, può essere indicata una densitometria ossea (MOC-DEXA) per valutare la mineralizzazione dell'osso all'inizio del trattamento o in caso di osteopenia/osteoporosi eseguire un trattamento specifico e monitoraggio periodico. È consigliabile, poi, un controllo annuale dei livelli ematici di colesterolo e trigliceridi dato l'aumentato rischio di ipercolesterolemia in caso di assunzione di AI.

Nel caso di assunzione di tamoxifene è, invece, consigliabile eseguire ecografia ginecologica ogni 6 mesi che prevede la valutazione dello spessore della rima endometriale allo scopo di individuare precocemente eventuali anomalie suggestive di carcinoma endometriale. È necessario, infine, riferire al medico ogni episodio di “sanguinamento vaginale” (AIOM 2018, Il follow up)

5. SEZIONE SPERIMENTALE

GnRHa in pazienti in trattamento ormonale adiuvante

5.1 Basi scientifiche

Ad oggi, si conosce poco sull'aspetto ecografico delle ovaie, sullo spessore endometriale, sui sanguinamenti anomali e sul profilo ormonale delle donne con carcinoma mammario in trattamento con GnRHa ed exemestane, durante la terapia ormonale adiuvante in età fertile.

Dai dati della letteratura, come abbiamo visto, si è evidenziata la presenza di un sottogruppo di pazienti al di sotto dei 35 anni di età per cui si è evidenziata una condizione di soppressione ovarica subottimale in relazione ai livelli di estradiolo considerati sicuri.

L'obiettivo del nostro studio è volto, pertanto, ad evidenziare e portare all'attenzione della comunità scientifica alcuni aspetti endocrino-ginecologici riscontrati in parte delle pazienti in trattamento con GnRHa ed exemestane, a seguito dei controlli di *follow-up* ginecologico eseguiti presso il nostro ambulatorio di oncofertilità.

In particolare, le nostre osservazioni si sono concentrate sulla persistenza di attività ovarica, sulla presenza di spotting o metrorragie non corrispondenti a patologie endometriali concomitanti, sulla presenza di algie pelviche non riconducibili ad alcuna patologia infiammatoria e/o aderenze pelviche, su uno spessore endometriale aumentato e livelli di estradiolo più elevati rispetto al gruppo di controllo in trattamento con Tamoxifene+OFS.

Il nostro studio, dunque, vuole mettere a confronto gli aspetti endocrino-ginecologici segno indiretto di un'inaspettata attività ovarica, riscontrati in corso di trattamento con exemestane e analoghi del GnRH (gruppo dei casi) e quelli riscontrati nelle pazienti in trattamento con Tamoxifene (gruppo dei

controlli). Un ulteriore obiettivo è quello di stabilire se vi siano dei vantaggi in termini di soppressione ovarica anticipando empiricamente la somministrazione dei GnRHa dai 28 giorni a 21, al fine di risolvere garantire una sicurezza maggiore per la paziente oncologica e cercare di comprendere i meccanismi sottesi a tale meccanismo.

La necessità di uno studio caso-controllo nasce dalla volontà di verificare se effettivamente, quanto riscontrato nella pratica clinica, abbia evidenze statistiche e non sia legato al caso.

5.2 Materiali e Metodi

Lo studio retrospettivo caso-controllo è stato condotto nell'ambulatorio di Oncofertilità del Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II. Su circa 300 giovani donne affette da neoplasia e afferite all'ambulatorio di oncofertilità dal 2013 a settembre 2019 per il *follow-up* clinico strumentale ginecologico in corso di trattamento oncologico, il 73% ha anamnesi personale positiva per carcinoma della mammella. Nell'ambito di questo sottogruppo, sono state prese in considerazione 66 pazienti selezionate e suddivise in due gruppi in base al tipo di protocollo terapeutico seguito.

Il primo gruppo (gruppo I), considerato il gruppo dei casi, è costituito da 40 pazienti in trattamento adiuvante con inibitore steroideo dell'aromatasi di terza generazione, exemestane (Exegen 25mg al giorno Genetic S.p.A., Italia). La soppressione ovarica è ottenuta con Leuprorelina (*Enantone*) o Triptorelina (*Decapeptyl*), agonisti del GnRH, alla dose di 3,75 mg ogni 28 giorni.

I criteri di inclusione per selezionare le pazienti sono stati:

- età compresa tra i 25 e i 48 anni;
- storia di cicli regolari prima della diagnosi di carcinoma mammario;

- conferma istologica della presenza di carcinoma mammario ormono-sensibile (definito come ER>10% e/o PgR>10%).

I criteri di esclusione sono stati:

- età > 49 anni e <24 anni;
- donne sottoposte, precedentemente, a chirurgia ginecologica, chirurgia ovarica e/o irradiazione ovarica;
- donne affette da patologie endocrinologiche e immunologiche.

Il secondo gruppo (gruppo II), di controllo, è costituito da 26 pazienti in trattamento adiuvante con modulatore selettivo del recettore degli estrogeni, tamoxifene (Novaldex 20mg/die) in associazione a Leuprorelina o Triptorelina, agonisti del GnRH, ogni 28 giorni.

I criteri di inclusione per questo gruppo sono stati:

- età compresa tra i 25 e i 48 anni
- storia di cicli regolari prima della diagnosi di carcinoma mammario
- conferma istologica della presenza di carcinoma mammario ormono-sensibile (definito come ER>10% e/o PgR >10%).

I criteri di esclusione sono stati:

- età > 49 anni e <24 anni;
- donne sottoposte, precedentemente, a chirurgia ginecologica, chirurgia ovarica e/o irradiazione ovarica;
- donne affette da patologie endocrinologiche e immunologiche.

Secondo quanto previsto dai protocolli di *follow-up* ginecologico in corso di ormonoterapia adiuvante del carcinoma mammario, le pazienti sono state esaminate presso il nostro ambulatorio con un primo controllo post trattamento a 6 mesi.

Le pazienti sono state sottoposte ad ecografia transvaginale per la valutazione di:

- Spessore e aspetto della mucosa endometriale, sulla cui base sottoposte o meno a isteroscopia
- Ecostruttura ovarica al fine di individuare eventuali movimenti follicolari in relazione allo stato di menopausa iatrogena.
- Presenza di formazioni transoniche al livello ovarico di diametro massimo superiore o pari ai 15 mm.

A tutte le pazienti sono stati chiesti dosaggi ormonali per la valutazione dei livelli basali di FSH, LH, estradiolo, estrone, delta-4-androstenedione e progesterone. È stato preso in considerazione:

- presenza di segni o sintomi riferiti quali spotting o metrorragia e algie pelviche;
- diagnosi di PCOS (Criteri di Rotterdam, 2003)
- terapia precedente con tamoxifene per le pazienti in attuale terapia con exemestane.

I dati raccolti sono stati confrontati tra il gruppo di studio e il gruppo di controllo.

Tra le pazienti in trattamento con exemestane + Agonista del GnRH abbiamo selezionato circa 19 pazienti per cui è stata empiricamente modificata la terapia accorciando a 21 giorni l'intervallo di somministrazione dell'GnRHα. I parametri, endocrinologici, ultrasonografici e anamnestici, già presi in considerazione, sono stati confrontati nelle stesse pazienti al tempo 0 (T0) e al tempo 1(T1) dopo circa 6 mesi dalla modifica della terapia.

5.1.2 Analisi statistica

Il *test esatto di Fisher* e il *T-test a due code* sono i due test statistici utilizzati per verificare se le differenze osservate tra le due popolazioni in studio possano essere o meno dovute al caso.

Il test χ^2 è stato utilizzato per valutare le differenze tra i due gruppi di studio nella distribuzione delle variabili nominali dicotomiche (ovaio compatto/non compatto, formazione transonica >15mm si/no, PCOS si/no, spotting si/no, metrorragie si/no, algie pelviche si/no, isteroscopia si/no).; il cutoff per rigettare l'ipotesi nulla(casualità) è $\chi^2 \geq 3,84$.

Le variabili continue (spessore endometriale, estradiolo, estrone, delta4 androstenedione, FSH, LH), invece, sono state analizzate con il T-test a due code per campioni indipendenti o il test di Mann-Whitney. La significatività statistica è stata fissata a *p value* <0,05

Nei pazienti in cui è stato effettuato l'accorciamento empirico dell'agonista del GnRH, i confronti pre e post trattamento sono stati effettuati con un Wilcoxon e il test McNemar. La significatività statistica è stata fissata a *p value* <0,05

5.3 Risultati

Nel primo gruppo in trattamento con exemestane e analogo del GnRH ogni 28 giorni, 20 pazienti su 40 all'ecografia transvaginale risultavano avere ovaie ad ecostruttura compatta, mentre 20 presentavano ecostruttura normale o multifollicolare. Inoltre, in 12 pazienti su 20 con ovaie con attività follicolare, sono state evidenziate formazioni transoniche del diametro superiore a 15 mm. Nel secondo gruppo in trattamento con Tamoxifene e analogo del GnRH, 18 pazienti su 26 risultavano avere ovaie ad ecostruttura compatta nell'esame

ecografico transvaginale, mentre 8 presentavano ecostruttura normale o multifollicolare, soltanto in una tra queste ultime pazienti è stata evidenziata una formazione transonica di diametro superiore a 15 mm. Per quanto concerne le algie pelviche sono state riscontrate anamnesticamente in 11 pazienti su 40 nel gruppo di studio.

Pertanto, i risultati statisticamente significativi che si sono ottenuti nella prima analisi riguardano il maggior riscontro di formazioni transoniche >15mm e algie pelviche nel gruppo in trattamento con exemestane rispetto al gruppo di controllo in trattamento con tamoxifene (**Tabella 6**).

Tabella 6. Caratteristiche cliniche e ultrasonografiche nei due gruppi caso-controllo

Clinical and ultrasonographic features	Treatment type		P
	Tam + GnRHa 26 (100)	Exe + GnRHa 40 (100)	
Age^a			
Mean (years)	35	38	0.046^b
+/- SD	7	6	
GnRH analogue			
Leuprorelin	19 (73)	26 (66)	0.49 ^c
Triptorelin	7 (27)	14 (34)	
Previous tamoxifen			
Yes	-	13 (33)	-
No	-	27 (67)	
Ultrasound ovarian structure			
With follicles	8 (31)	20 (50)	0.12 ^c
Without follicles	18 (69)	20 (50)	
Anechoic ovarian cists > 15mm			
Yes	1 (4)	12 (30)	0.009^c
No	25 (96)	28 (70)	
Endometrial thickness (mm)			
Mean	5.73	4.6	0.14 ^b
+/- SD	2.58	3.25	
Polycystic ovarian syndrome			
Yes	1 (4)	2 (5)	0.83 ^c
No	25 (96)	38 (95)	
Spotting			
Yes	3 (12)	12 (30)	0.08 ^c
No	23 (88)	28 (70)	
Pelvic pain			
Yes	2 (8)	11 (27)	0.048^c
No	24 (92)	29 (73)	
Hysteroscopy			
Yes	11 (42)	13 (32)	0.42 ^c
No	15 (58)	27 (68)	

Tam: tamoxifen; Exe: exemestane; GnRHa: GnRH analogue; SD: standard deviation; ^a: Values are rounded; ^b: P values were obtained with the two-tailed t-test for independent samples with equal variances; ^c: P values were obtained with the χ^2 tests

Gli altri parametri analizzati non sono risultati significativi ma si è registrato un incremento dello *spotting* tra le pazienti oggetto di studio rispetto ai controlli oltre che dell'ecostruttura ovarica non compatta.

I risultati relativi ai profili ormonali hanno mostrato un incremento statisticamente significativo dei livelli di FSH circolanti nel gruppo trattato con GnRHa ed exemestane e livelli di estradiolo e delta-4-androstenedione seppur non significativi maggiori tra quest'ultimo gruppo di pazienti (**Tabella 7**).

Tabella 7. Profili endocrini tra i due gruppi

Endocrine Profile	Treatment type		Differences between means	Percentage difference	P ^a
	Tam + GnRHa 26 (100)	Exe + GnRHa 40 (100)			
Estradiol (pg/mL)					
Mean	17.29	29.98			
+/- SD	12.32	36.87	-12.68	-42%	0.85
Estrone (pg/mL)					
Mean	73.03	46.17			
+/- SD	59.17	67.82	26.86	+58%	0.2
Delta-4-androstenedione (ng/mL)					
Mean	2.23	21.81			
+/- SD	0.61	49.82	-19-58	-90%	0.43
Progesterone (ng/mL)					
Mean	NE	0.46			
+/- SD	NE	0.4	-	-	-
FSH (mUI/mL)					
Mean	2.47	5.82			
+/- SD	2.36	2.36	-3.35	-58%	0.013
LH (mUI/mL)					
Mean	0.39	0.66			
+/- SD	0.21	0.74	-0.27	-41%	0.1

Tam: tamoxifen; Exe: exemestane; GnRHa: GnRH analogue; SD: standard deviation; ^a: P values were obtained with the Mann-Whitney test for independent samples

Per quanto riguarda il sottogruppo di pazienti trattate con un accorciamento dell'intervallo di somministrazione del GnRHa a 21 giorni già le prime 12 pazienti hanno mostrato un miglioramento statisticamente significativo delle algie pelviche, dello spotting e dell'ecostruttura ovarica e una riduzione dei

livelli circolanti di estradiolo. L'ulteriore reclutamento di pazienti fino ad un numero di 19 ha confermato le significatività già riscontrate ed in più ha evidenziato anche una riduzione dello spessore endometriale e della presenza di formazioni follicolari superiori ai 15 mm al tempo T1 di osservazione (**Tabella 8**).

Tabella 8 Confronto tra pazienti trattate con Agonisti del GnRH ogni 21 giorni al tempo 0 e T1 dall'inizio della terapia

Variables	Exe+GnRHa patients T0 (N = 19)	Exe+GnRHa patients T1 (N = 19)	<i>p. value</i> ^{a, b}
Ultrasound Ovarian structure [N (%)]^a			
With follicles	19 (100)	9 (47.40)	
Without follicles	0 (0)	10 (52.60)	.000***
Anechoic Ovarian Cysts > 15mm [N (%)]^a			
No	7 (36.80)	15 (78.90)	
Yes	12 (63.20)	4 (21.10)	.020*
Endometrial Thickness (mm) [Mean (± SD)]^b	0.63 (0.50)	0.21 (0.42)	.013*
Estradiol (pg/mL) [Mean (± SD)]^b	37.37 (± 45.17)	21.78 (± 25.82)	.000***
Estrone (pg/mL) [Mean (± SD)]	47.32 (± 73.66)	43.88 (± 34.40)	.574
FSH [Mean (± SD)]^b	6.88 (± 3.36)	6.53 (± 3.19)	.399
LH [Mean (± SD)]^b	0.78 (± 0.91)	0.65 (± 0.69)	.218
Spotting [N (%)]^a			
No	7 (36.80)	16 (84.21)	
Yes	12 (63.20)	1 (5.36)	
Missing	0 (0)	2 (10.53)	.000***
Pelvic Pain [N (%)]^a			
No	9 (47.40)	15 (78.94)	
Yes	10 (52.60)	2 (10.53)	
Missing	0 (0)	2 (10.53)	.014*

Note. N (%) or Mean (± SD). Differences were determined by Chi-square test^a or Wilcoxon signed-rank test^b. **p* < .05, ***p* < .01, ****p* < .001.

5.4 DISCUSSIONE

Di fronte a patologie che impattano così gravemente sulla qualità di vita del soggetto, come una neoplasia, alcuni degli obiettivi principali del medico devono essere quelli di garantire quanto più è possibile il benessere dell'assistito per tutta la durata del trattamento, prevenire la possibile comparsa di complicanze e garantire infine l'adesione a terapie adeguate. Queste sono le motivazioni che giustificano l'attento *follow-up* nelle pazienti oncologiche che afferiscono presso il nostro ambulatorio di oncofertilità.

Per molti anni la scena terapeutica nelle pazienti giovani in premenopausa, per quanto concerne la fase adiuvante del trattamento del tumore mammario, è stata dominata unicamente dal tamoxifene. In virtù degli effetti noti di questo farmaco al livello endometriale uno degli obiettivi del *follow-up* è prevenire l'insorgenza di nuove patologie dell'utero e complicanze.

Nel corso del nostro studio tra le variabili prese in considerazione c'è infatti lo spessore endometriale ed effettivamente come atteso, anche in base a quanto già studiato in letteratura, questo è risultato più elevato nelle pazienti in trattamento con tamoxifene rispetto a quelle in trattamento con exemestane.

Osservando però la media delle misurazioni ottenute nel gruppo trattato con inibitore dell'aromatasi, a prescindere dal confronto tra i due gruppi, si nota che quest'ultima è intorno ai 4 mm, con alcune pazienti che arrivano ad avere uno spessore endometriale di 7 mm.

Queste misurazioni, tuttavia, non indicano alcun tipo di effetto proprio dell'exemestane sull'endometrio e sono facilmente giustificate tenendo in considerazione il fatto che alcune delle pazienti incluse nel gruppo di studio,

avevano effettuato un periodo iniziale di trattamento con tamoxifene, prima di intraprendere il protocollo terapeutico più recente.

Nel corso della nostra attività ambulatoriale, abbiamo altresì notato che molte delle pazienti in trattamento con exemestane mantenevano un aspetto ecografico normale o addirittura multifollicolare delle ovaie nonostante le terapie ormonali in atto e l'associazione con l'agonista del GnRH a 28 giorni, non in linea con il normale effetto del farmaco. Inoltre, i livelli di estradiolo e di FSH riscontrati in queste pazienti, come già detto, suggeriscono una condizione di soppressione subottimale con inadeguata desensibilizzazione ipofisaria.

È interessante notare come i suddetti valori coincidano poi, in molte delle pazienti, proprio con la persistenza dei movimenti follicolari e la presenza di spotting e metrorragia.

Ad oggi non siamo ancora a conoscenza delle possibili motivazioni legate a questo tipo di risposta dell'asse ipotalamo – ipofisi - ovaio in alcune delle pazienti. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nel *pathway* alla base dell'inibitore dell'aromatasi: il forte clima ipoestrogenico, indotto dal farmaco, va ad eliminare il meccanismo di *feedback* negativo sull'asse ipofisario, incrementando il rilascio di FSH e LH endogeni.

Questa ipotesi non è, però, applicabile alle pazienti trattate con analoghi del GnRH che inibiscono a monte la secrezione endogena di FSH e LH, con azione desensibilizzante sui recettori ipofisari. A meno che non si consideri una produzione di FSH indipendente dal controllo ipotalamico e attivata in qualche modo dall'exemestane.

L'attenzione deve, dunque, essere posta sull'associazione dei due farmaci, inibitore dell'aromatasi ed agonista. È possibile che vi siano dei meccanismi ancora sconosciuti che influenzino la risposta di alcune pazienti a questo tipo di terapia.

Altra ipotesi in grado di spiegare tale anomala attività ovarica può risiedere nella farmacocinetica del farmaco, infatti si registrerebbe la più bassa attività

farmacologica nell'ultima settimana dalla somministrazione ed in tali giorni lo spiccato ipoestrogenismo indotto dall'inibitore dell'aromatasi potrebbe essere in grado di favorire rilascio di gonadotropine con conseguente riattivazione ovarica. Questa ipotesi potrebbe essere avvalorata dai risultati ottenuti dall'empirico accorciamento dell'intervallo di somministrazione della terapia (da 28 a 21 giorni) tale da contrastare l'inadeguata soppressione ovarica.

Ciò apre la strada alla necessità di una personalizzazione terapeutica, basata sulle caratteristiche e sulle risposte della singola paziente, così da migliorarne la *compliance* e conseguentemente il successo terapeutico.

Sembra, dunque, che la variazione di frequenza della somministrazione degli agonisti del GnRH rappresenti al momento una valida strategia terapeutica.

Per poter avvalorare tali risultati, comprendere al meglio i meccanismi etiopatogenetici e ridurre i possibili *bias* di selezione, sono necessari ulteriori studi con maggiore numerosità campionaria e una estesa programmazione di *follow-up* sistematico endocrino-ginecologico in tutte le pazienti in corso di tali terapie.

6 SEZIONE SPERIMENTALE

Stimolazione ovarica controllata con gonadotropine esogene in pazienti con K mammario: Profili ormonali e outcomes riproduttivi – ruolo del GnRHα nel *triggering*

6.1 Basi scientifiche

Una grande problematica relativa al congelamento degli ovociti e degli embrioni è la necessità di praticare una Stimolazione Ovarica Controllata in pazienti con tumori ormono-sensibili, come il carcinoma della mammella, che rappresenta oltre un terzo delle neoplasie diagnosticate in donne in età riproduttiva (AIOM-AIRTUM, 2016). Per queste pazienti, pertanto, sono state sviluppate diverse strategie: l'utilizzo degli inibitori di aromatasi evita che alte

concentrazioni di estradiolo in corso di stimolazione possano favorire la proliferazione delle cellule maligne, mentre l'utilizzo del protocollo di emergenza *random start* permette di iniziare la stimolazione anche quando la paziente si trova in fase follicolare tardiva o luteale del suo ciclo mestruale, senza eccessivi ritardi nell'inizio della terapia antineoplastica.

Il presente studio risponde, quindi, alla necessità di valutare, nella nostra esperienza diretta, l'efficacia e la sicurezza delle suddette strategie di Stimolazione Ovarica Controllata e, in particolare, l'impatto in fase luteale dell'impiego del letrozolo.

Presso l'Ambulatorio di Oncofertilità afferente al Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche dell'AOU "Federico II" sono stati eseguiti, ad oggi, circa 1000 counseling di giovani pazienti oncologici e nel 70% delle pazienti donne si è trattato di pazienti affette da carcinoma mammario.

Di queste, sono state analizzate retrospettivamente tutte le donne sottoposte a Stimolazione Ovarica Controllata (COS) con letrozolo e congelamento degli ovociti recuperati, attuando i protocolli vigenti in letteratura.

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare gli *outcomes* della Stimolazione Ovarica Controllata confrontando una coorte di pazienti affette da carcinoma della mammella, in attesa di terapia antineoplastica, in cui è stato utilizzato il letrozolo con una coorte di pazienti sane trattate per infertilità.

Al fine di ridurre i potenziali fattori di confondimento, entrambe le popolazioni sono state stratificate in base al farmaco somministrato per indurre l'ovulazione, HCG o Agonista del GnRH.

Tra le pazienti oncologiche si è proceduto poi a confrontare il gruppo delle pazienti sottoposte a COS Standard e il gruppo di quelle sottoposte a COS con inizio *random start*.

6.2 Materiali e Metodi

I criteri utilizzati per selezionare le pazienti da includere nel gruppo di stimolazione con inibitore di aromatasi sono stati:

- Età compresa tra i 20 e i 40 anni
- Body Mass Index (BMI) tra 18,50 e 24,99
- Conferma istologica della presenza del carcinoma mammario
- Livelli basali di Ormone Follicolostimolante (FSH) < 12 mU/ml e/o Conta dei Follicoli Antrali (AFC) ≥ 7 e/o Ormone AntiMulleriano (AMH) $\geq 0,8$ ng/ml
- Chemio e/o radioterapia non ancora eseguita

Sono state escluse dallo studio tutte le donne in cui non si poteva procedere ad una stimolazione ovarica per l'immediato e necessario inizio del trattamento chemioterapico.

Tutte le pazienti, previo appropriato counselling, hanno firmato un dedicato consenso informato.

Per tutte le pazienti dello studio è stato utilizzato il protocollo di induzione dell'ovulazione a mezzo di gonadotropine associate a inibitori di aromatasi. Sono stati adoperati due approcci: il protocollo standard è stato impiegato in tutte le pazienti in cui era possibile ritardare l'inizio della terapia antineoplastica sincronizzando la stimolazione con l'inizio del ciclo mestruale, mentre il protocollo di emergenza *random start* è stato impiegato in tutte le pazienti che necessitavano di un più tempestivo inizio del trattamento chemioterapico.

Sono stati utilizzati in tutti i casi 5 mg/die di letrozolo a partire dal secondo-terzo giorno del ciclo mestruale (COS Standard), o in fase follicolare avanzata – fase luteale (COS Random Start). Dopo due-tre giorni è stata aggiunta una dose giornaliera di r-FSH personalizzata per ciascuna paziente in relazione alla riserva follicolare e alla risposta ovarica (da 150 a 225 UI/die sottocute).

L'antagonista del GnRH è stato somministrato con dosaggio 0,25 mg/die quando le dimensioni del follicolo dominante hanno superato i 14 mm secondo un *flexible protocol*.

L'induzione dell'ovulazione (triggering) è stata ottenuta con 10.000 UI s.c. di HCG o con Agonista del GnRH (triptorelina o buserelina) 0,2 mg s.c. In tutte le pazienti la dose ovulatoria è stata somministrata in presenza di almeno un follicolo > 17 mm di diametro medio.

In un'unica paziente è stato utilizzato un long protocol: la desensibilizzazione ipofisaria è stata ottenuta con somministrazione di una singola dose (3,75 mg) di formulazione *Depot* di triptorelina, effettuata in fase luteale avanzata. Dopo 15 giorni dalla somministrazione il grado di soppressione è stato stimato con la misurazione dei livelli sierici di estradiolo e la valutazione ecografica transvaginale (USG-TV) dello stato endometriale e si è iniziata la stimolazione con somministrazione di letrozolo (5 mg/die) e r-FSH (187,5 UI/die). La dose ovulatoria di 10.000 UI s.c. di HCG è stata somministrata dopo quattordici giorni di stimolazione.

Il prelievo ovocitario è stato eseguito in tutte le pazienti per via trans-vaginale eco-guidata, 34-36 ore dopo il triggering. Infine, il trattamento con il letrozolo è stato ripreso dopo il *pick up* e continuato fino al riscontro di livelli di estradiolo inferiori a 50 pg/ml.

La stimolazione ovarica controllata è stata portata a termine con successo in tutte le pazienti affette da carcinoma della mammella.

Si è proceduto quindi alla crioconservazione degli ovociti in Metafase II, risultati idonei al congelamento, utilizzando la più moderna ed efficace procedura di vitrificazione.

Le caratteristiche cliniche, gli aspetti principali legati alla neoplasia e le informazioni relative alla procedura di PMA delle pazienti affette carcinoma della mammella sono riportate in **Tabella 9**.

Caso	Età	ER (%)	PgR (%)	Triggering	Inizio	Estradiolo	Estradiolo	P	Progesterone	P	Ovociti	Ovociti
1	31	70	75	HCG	sCO	474	17	140,	9	9	9	
2	20	10	14	HCG	sCO	105	32	22	3	3		
3	38	0	2	GnRH	sCO	464	57,3	191	20	10		
4	40	85	80	HCG	sCO	480	73,0	36,1	8	5		
5	36	0	0	GnRH	sCO	804	70	17,7	8	7		
6	37	0	0	GnRH	sCO	156	37,8	41	7	4		
7	34	90	85	GnRH	rCO	219,	36	227,	20	15		
8	37	0	0	GnRH	sCO	178	36	24,8	12	11		
9	31	80	5	GnRH	rCO	410	11,9	4,2	13	11		
10	36	80	38	HCG	sCO	528	93,7	81	11	9		
11	38	95	95	HCG	sCO	1024	48	394	10	9		
12	27	85	85	GnRH	sCO	1060	69,8	518,	23	21		
13	30	90	90	GnRH	rCO	536	44	5,7	22	22		
14	26	60	90	GnRH	rCO	800	45	18	14	12		
15	33	90	75	GnRH	rCO	477	50	28	14	12		
16	38	90	80	GnRH	sCO	596	31,8	37	9	7		
17	28	0	0	GnRH	rCO	521,	56,9	3,95	12	8		
18	37	85	80	GnRH	rCO	334,	23	25	6	6		
19	39	80	90	GnRH	rCO	180	22,7	9,26	2	2		
20	36	90	80	GnRH	sCO	502	89,2	18,3	11	8		
21	25	90	5	GnRH	rCO	858	48	8,7	9	9		
22	38	70	40	GnRH	rCO	606	46	15,4	23	20		
23	34	90	80	GnRH	rCO	297	20	6,93	5	4		
24	34	70	50	GnRH	sCO	326,	5	2,43	7	7		
25	28	90	80	GnRH	sCO	1732	54	35	18	16		
26	35	0	0	GnRH	sCO	166	39	9,6	6	6		
27	36	75	50	GnRH	sCO	240	22,1	7,9	13	11		

Tabella 9. Caratteristiche generali, dosaggi ed esiti della procedura di PMA in pazienti affette da carcinoma della mammella [ER: recettore estrogenico; PgR: recettore del progesterone; HCG: Human Chorionic Gonadotropin; GnRH: Agonista del GnRH; sCOS: Stimolazione Ovarica Controllata Standard; rCOS: Stimolazione Ovarica Controllata con inizio random start; PU: Pick Up].

La popolazione di controllo è stata selezionata tra le pazienti infertili afferenti all'ambulatorio di Sterilità ed Infertilità di coppia dell'AOU "Federico II".

I criteri di inclusione sono stati:

- Età compresa tra i 27 e i 39 anni
- BMI compreso tra 18,5 e 35
- Diagnosi di sterilità
- Livelli basali di Ormone Follicolostimolante (FSH) < 12 mU/ml e/o Conta dei Follicoli Antrali (AFC) ≥ 7 e/o Ormone Antimulleriano (AMH) $\geq 0,8$ ng/ml

Per le pazienti infertili è stato adoperato un protocollo standard di stimolazione, personalizzando il tipo e il dosaggio di gonadotropine impiegate. In breve, dopo la valutazione ormonale e il controllo ecografico per stabilire la conta dei follicoli antrali (AFC), al terzo giorno del ciclo mestruale sono state somministrate gonadotropine, seguite da impiego di antagonista del GnRH quando almeno un follicolo ha raggiunto i 15 mm di diametro medio. L'induzione dell'ovulazione è stata ottenuta con HCG (10.000 UI s.c.) o con l'Agonista del GnRH triptorelina (0,2 mg s.c.). In tutte le pazienti la dose ovulatoria è stata somministrata in presenza di almeno un follicolo > 17 mm di diametro medio.

Per tutte le pazienti del gruppo controllo è stato utilizzato un supporto della fase luteale, somministrando progesterone (50-200 mg/die) i.m., vaginale o s.c., per quattordici giorni iniziando dopo il prelievo ovocitario.

6.3 Risultati

Nel presente studio sono state analizzate 27 pazienti affette da carcinoma della mammella sottoposte a Stimolazione Ovarica Controllata con l'impiego di letrozolo e 44 pazienti infertili sottoposte a Stimolazione Ovarica Controllata senza l'utilizzo del letrozolo e sottoposte a supplementazione luteale con progesterone esogeno.

Nel gruppo delle pazienti oncologiche l'estradiolo al picco è stato adeguatamente contenuto risultando in media di 521.29 ± 348.29 pg/ml. Per l'induzione dell'ovulazione è stato somministrato HCG in 5 pazienti e Agonista del GnRH in 22. I livelli di estradiolo e progesterone misurati a tre-cinque giorni dal Pick Up sono risultati in media di 43.3 ± 22.4 pg/ml e di 71.48 ± 123.33 ng/ml rispettivamente. Nello specifico questi ultimi sono risultati elevati (> 40 ng/ml) in 7 pazienti, di cui 3 indotte con HCG e 4 con Agonista del GnRH. Si è prelevato un numero di ovociti compreso tra 2 e 23.

Nel gruppo controllo si è registrato un estradiolo al picco in media di 1131.52 ± 383.21 . Per l'induzione dell'ovulazione è stato somministrato HCG in 30 pazienti infertili e Agonista del GnRH in 14. I livelli di progesterone dosati a tre giorni dal prelievo ovocitario, in corso di supplementazione luteale con varie formulazioni di progesterone esogeno, sono risultati di 49.95 ± 23.35 ng/ml. Si è prelevato un numero di ovociti compreso tra 1 e 15.

Le variabili continue sono state analizzate adoperando il test t di Student a due code. Un p value $< 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Le due coorti di studio e di controllo sono risultate comparabili per età e BMI. Si è registrata, invece, differenza statisticamente significativa per tutti gli altri parametri presi in esame. In particolare, dal confronto tra le pazienti oncologiche trattate con letrozolo e le pazienti infertili emerge che i valori medi di AMH e progesterone post PU sono risultati maggiori nel primo gruppo (p value $< 0,05$), così come i numeri medi di ovociti prelevati e maturi (p value $< 0,01$), mentre il valore medio di estradiolo al picco è risultato maggiore nel secondo gruppo (p value $< 0,01$). (**Tabella 10**)

	Casi (n=27)	Controlli	p value
Età (anni)	33,41 ± 5,23	33,98 ± 3,47	0,65
BMI (kg/m ²)	22,37 ± 1,66	22,63 ± 3,09	0,47
AMH (ng/ml)	3,45 ± 1,73	2,65 ± 1,83	0,03
Estradiolo al picco (pg/ml)	521.29 ± 269,37	1.131,52	± 0,0000
Progesterone post PU	71,48 ± 123,3	49,95 ± 23,35	0,04
Ovociti raccolti	11,66 ± 5,87	7,32 ± 2,84	0,0001
Ovociti maturi	9,77 ± 5,19	5,71 ± 2,22	0,0001

Tabella 10. Confronto tra casi e controlli. Valori espressi come media e deviazione standard.

Stratificando le popolazioni, i due gruppi di studio e di controllo sono risultati comparabili per età e BMI sia in caso di triggering con HCG (**Tabella 11**) che in caso di triggering con Agonista del GnRH (**Tabella 12**).

Il valore medio di AMH pre-trattamento è risultato significativamente più elevato (p value < 0,05) nelle pazienti oncologiche che nel protocollo di stimolazione hanno adoperato HCG rispetto alle pazienti infertili che hanno utilizzato lo stesso farmaco.

Sia in caso di induzione con HCG che in caso di induzione con Agonista del GnRH si è registrato un dosaggio medio di estradiolo al picco significativamente più alto (p value < 0,01) nel gruppo controllo di pazienti infertili rispetto alle pazienti oncologiche, in accordo con la somministrazione di letrozolo.

Il valore medio di progesterone post PU è risultato significativamente maggiore (p value < 0,01) nei casi rispetto a quello riscontrato nei controlli per il triggering con HCG e comparabile (p value = 0,37) nei due gruppi per il triggering con Agonista del GnRH.

Nella sottopopolazione dei casi in cui è stato utilizzato l'Agonista del GnRH si è registrato un numero medio di ovociti raccolti e di ovociti maturi significativamente più alto (p value < 0,05) rispetto ai controlli. La stessa

differenza non si è riscontrata confrontando il numero medio di ovociti raccolti (p value = 0,15) e di ovociti maturi (p value = 0,16) tra le due sottopopolazioni di casi e controlli in cui è stato utilizzato l'HCG.

	Casi (n=5)	Controlli (n=30)	p value
Età (anni)	33,00 ± 7,16	34,67 ± 3,21	0,38
BMI (kg/m2)	22,08 ± 2,13	22,18 ± 1,73	0,91
AMH (ng/ml)	3,23 ± 0,53	1,91 ± 1,25	0,028
Estradiolo al picco (pg/ml)	522,20 ± 293,26	1.044,82 ± 285,16	0,0006
Progesterone post PU	134,77 ± 136,07	44,51 ± 17,54	0,0007
Ovociti raccolti	8,20 ± 2,79	6,33 ± 2,71	0,17
Ovociti maturi	7,00 ± 2,53	5,45 ± 2,28	0,17

Tabella 11. Confronto tra casi e controlli trattati con HCG. Valori espressi come media e deviazione standard.

	Casi (n=22)	Controlli (n=14)	p value
Età (anni)	33,5 ± 4,32	32,50 ± 3,54	0,45
BMI (kg/m2)	22,37 ± 1,46	23,54 ± 4,63	0,27
AMH (ng/ml)	3,48 ± 1,85	4,18 ± 1,90	0,63
Estradiolo al picco (pg/ml)	521,29 ± 259,45	1304,93 ± 482,52	0,00001
Progesterone post PU (ng/ml)	71,48 ± 138,46	61,61 ± 29,24	0,59
Ovociti raccolti	12,45 ± 6,15	9,43 ± 1,76	0,04
Ovociti maturi	10,4 ± 5,56	6,56 ± 1,77	0,01

Tabella 12. Confronto tra casi e controlli trattati con Agonista del GnRH. Valori espressi come media e deviazione standard.

All'interno della sola coorte di pazienti affette da carcinoma della mammella e sottoposte a Stimolazione Ovarica Controllata con utilizzo di letrozolo i due

gruppi selezionati in base all'utilizzo di HCG e Agonista del GnRH per indurre l'ovulazione, sono risultati comparabili per età, BMI, AMH, Estradiolo al picco, estradiolo post PU, progesterone post PU, ovociti raccolti e ovociti maturi (**Tabella 13**).

	HCG (n=5)	GnRH-a (n=22)	p value
Età (anni)	33,00 ± 7,16	33,5 ± 4,32	0,81
BMI (kg/m2)	22,08 ± 2,13	22,37 ± 1,46	0,99
AMH (ng/ml)	3,23 ± 0,53	3,48 ± 1,85	0,49
Estradiolo al picco (pg/ml)	522,20 ± 293,26	521.29 ± 259,45	0,77
Estradiolo post PU (pg/ml)	50,76 ± 30,39	43,30 ± 16,74	0,45
Progesterone post PU (ng/ml)	134,77 ± 136,07	71,48 ± 138,46	0,47
Ovociti raccolti	8,20 ± 2,79	12,45 ± 6,15	0,12
Ovociti maturi (MII)	7,00 ± 2,53	10,4 ± 5,56	0,19

Tabella 13. Confronto tra modalità di triggering nelle pazienti oncologiche dello studio. HCG: Human Chorionic Gonadotropin; GnRH-a: Agonista del GnRH. Valori espressi come media e deviazione standard.

In queste stesse pazienti il confronto tra la sottopopolazione in cui è stato impiegato il protocollo di stimolazione standard e quella in cui è stato impiegato il protocollo di stimolazione *random start* non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa in riferimento ai parametri presi in esame (età, BMI, AMH, estradiolo al picco, estradiolo post PU, progesterone post PU, ovociti raccolti e ovociti maturi) (**Tabella 14**).

	sCOS (n=16)	rCOS (n=11)	p value
Età (anni)	34,19 ± 5,74	32,27 ± 4,12	0,39
BMI (kg/m2)	22,08 ± 1,74	22,8 ± 1,34	0,20
AMH (ng/ml)	2,91 ± 2,09	2,99 ± 1,17	0,93
Estradiolo al picco (pg/ml)	552,21 ± 310,22	476,31 ± 185,35	0,44
Estradiolo post PU (pg/ml)	47,86 ± 23,62	36,68 ± 14,60	0,15
Progesterone post PU (ng/ml)	98,58 ± 161,59	32,06 ± 71,37	0,13
Ovociti raccolti (n.)	10,93 ± 5,50	12,72 ± 6,15	0,47
Ovociti maturi (n.)	8,93 ± 4,60	11,00 ± 5,63	0,33

Tabella 14. Confronto tra Stimolazione Ovarica Controllata Standard (sCOS) e Stimolazione Ovarica Controllata random start (rCOS) nelle pazienti oncologiche dello studio. Valori espressi come media e deviazione standard.

6.4 Discussione

Nel presente studio retrospettivo sono stati analizzati gli outcomes della stimolazione ovarica controllata con impiego di letrozolo in una coorte di pazienti affette da carcinoma della mammella, afferite al nostro centro per sottoporsi ad un programma di preservazione della fertilità in vista di un successivo trattamento antineoplastico. La popolazione di controllo, omogenea per parametri demografici, antropometrici e ormonali, è stata rappresentata da una coorte di pazienti sane trattate per infertilità.

I risultati ottenuti relativamente ai valori di estradiolo al picco registrati nelle due coorti analizzate confermano l'efficacia dell'aggiunta dell'inibitore di aromatasi nel protocollo di stimolazione delle pazienti affette da carcinoma della mammella, in accordo con gli studi già presenti in letteratura al riguardo (Reddy J, 2012) (Domingo J, 2016) (Kim J, 2016). Il letrozolo è un inibitore di aromatasi che blocca il processo di trasformazione aromatica degli androgeni in estrogeni (Bhatnagar AS, 2007). Dalla nostra esperienza è emerso che, grazie all'utilizzo del letrozolo, è stato possibile ottenere dei valori di estradiolo durante la stimolazione significativamente più bassi rispetto ai trattamenti standard e di poco dissimili da quelli osservati nell'ambito di un ciclo sessuale fisiologico nella maggior parte dei casi. È tuttavia necessario ricordare che, essendo presenti in letteratura evidenze che attribuiscono al letrozolo un potenziale effetto teratogeno (Azim AA, 2008), il suo impiego nei protocolli di stimolazione ovarica controllata è ad oggi in Italia considerato off label (AIFA, 2005).

Nel presente studio si conferma, inoltre, che l'utilizzo del letrozolo in corso di stimolazione ovarica controllata non riduce la percentuale di ovociti maturi, né modifica la loro morfologia (Pereira N, 2016).

I risultati relativi al prelievo ovocitario indicano che il numero medio di ovociti raccolti e maturi è più alto in maniera statisticamente significativa nelle pazienti oncologiche rispetto al gruppo di controllo di pazienti infertili. Dal momento che sia l'età che il BMI dei due gruppi sono risultati comparabili, ciò potrebbe

essere dovuto alla condizione di sterilità delle donne infertili candidate all'esecuzione delle tecniche di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) in cui si è registrato, infatti, anche un più basso valore medio di AMH pretrattamento, parametro considerato altamente predittivo della risposta ovarica alla stimolazione (Fleming R, 2015).

Inoltre, è da sottolineare che, sia in caso di *triggering* con HCG sia con Agonista del GnRH, in quasi tutte le pazienti con carcinoma della mammella si è riusciti a prelevare un numero di ovociti maturi superiore a 8, cut-off attualmente raccomandato in letteratura per ottenere ragionevolmente il successo della procedura (Cobo A, 2016).

Il dato più significativo che emerge tuttavia dalla nostra esperienza è il riscontro, per la prima volta, di livelli sierici di progesterone in fase luteale più elevati e statisticamente significativi nelle pazienti oncologiche trattate con letrozolo, rispetto alla popolazione di controllo di pazienti infertili, nonostante in queste ultime tali livelli siano comprensivi della supplementazione luteale con progesterone necessaria al successo della tecnica di PMA adoperata. Tale riscontro è stato oggetto di interesse della letteratura scientifica negli ultimi anni (Alvigi C *et al.*, 2017; Del Pup L *et al.*, 2018).

Per comprendere quali variabili potessero impattare su tale risultato si è proceduto ad una stratificazione a posteriori in base al tipo di farmaco utilizzato per indurre la maturazione finale degli ovociti e in base al timing dell'inizio della stimolazione (protocollo convenzionale versus protocollo random start). Dalla nostra analisi si sono evidenziati dei livelli circolanti di progesterone, dosati a tre-cinque giorni dal prelievo ovocitario, più elevati nei casi oncologici rispetto ai controlli infertili. Mentre in caso di *triggering* con Agonista del GnRH tale riscontro, seppur non statisticamente significativo, rimane interessante e necessita sicuramente di ulteriore approfondimento, la differenza tra i due gruppi è risultata statisticamente significativa in caso di *triggering* con HCG.

Non si è registrata, invece, alcuna differenza statisticamente significativa tra le pazienti oncologiche sottoposte a stimolazione ovarica standard e le pazienti

oncologiche sottoposte a protocollo con inizio random start, confermando

l'efficacia e la sicurezza del protocollo di emergenza (Sönmezer M, 2011) (Cakmak H, 2013) (Kim JH, 2015).

La variabile, dunque, che sembra avere il maggiore impatto nel determinare il rialzo dei valori di progesterone in fase luteale in corso di stimolazione ovarica con letrozolo è, nella nostra esperienza, l'utilizzo di HCG per indurre l'ovulazione.

Questi dati confermano una nostra iniziale osservazione già pubblicata in letteratura relativa a tre casi (Alviggi C, 2017).

Esiste tuttavia una discrepanza con i dati emersi da un altro recente studio che mette a confronto il profilo ormonale delle pazienti stimolate con l'aggiunta del letrozolo rispetto alle pazienti PMA standard supplementate con progesterone in fase luteale (Goldrat O, 2015). In questa casistica non è stata ritrovata, infatti, alcuna differenza statisticamente significativa tra i livelli di progesterone dei due gruppi.

Le diverse evidenze dei due studi potrebbero essere dovute all'adozione, in alcune pazienti del centro di Goldrat, di un protocollo modificato, con impiego in fase luteale di antagonista del GnRH in associazione o in sostituzione del letrozolo. Inoltre, va segnalato l'utilizzo, in alcune nostre pazienti, di agonisti del GnRH per la protezione gonadica, effettuato dopo pochi giorni dal prelievo ovocitario.

Due potrebbero essere le possibili spiegazioni dell'eccessivo incremento dei livelli di progesterone in fase luteale in pazienti trattate con letrozolo: l'una è da ricercarsi nell'aumento dell'LH secondario al forte clima ipoestrogenico indotto dal letrozolo, venendo così a mancare l'effetto di feedback negativo sull'asse ipofisario.

Una seconda ipotesi è che l'inibizione dell'aromatasi favorisca un accumulo di substrato a monte del pathway enzimatico, portando all'aumento di precursori tra cui il progesterone (Stanczyk FZ, 1997) (**Figura 6**).

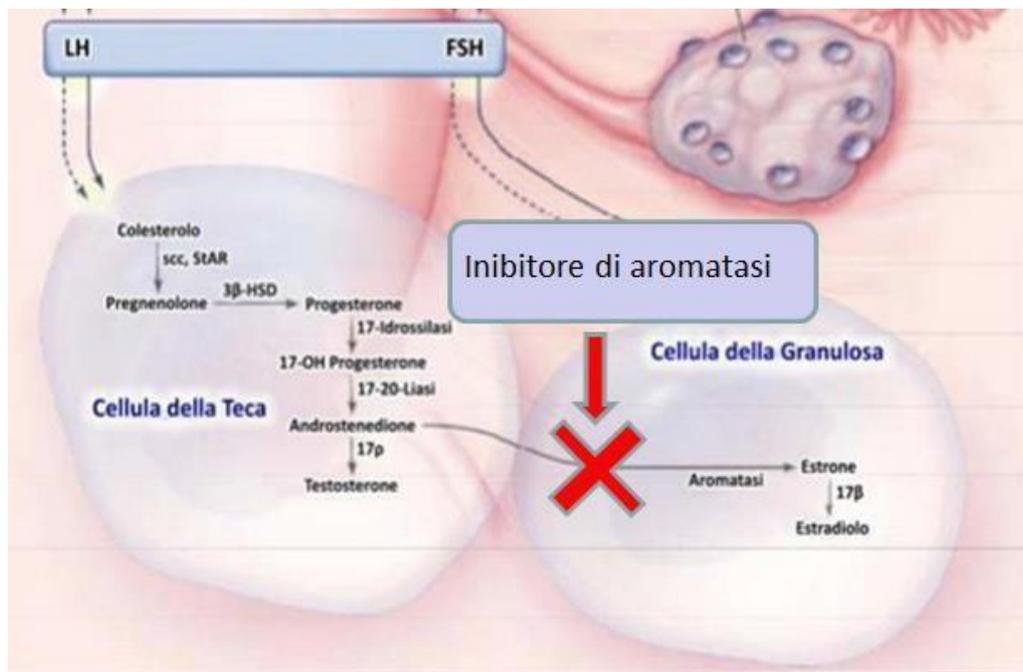


Figura 6. Meccanismo d'azione degli inibitori dell'aromatasi e ricadute sulla fase luteale.

L'interpretazione di questi risultati dovrebbe inoltre tener conto di una possibile risposta individuale delle pazienti alla somministrazione di letrozolo, dovuta probabilmente ad una predisposizione di natura genetica.

Lo studio condotto presso il nostro Centro presenta però dei limiti che andrebbero considerati per una corretta valutazione dei risultati: tutte le pazienti sono state arruolate retrospettivamente e i due campioni studiati sono stati estratti da due popolazioni diverse (casi con carcinoma della mammella e controlli infertili) comportando potenziali *bias* di selezione. Sono stati comunque definiti i criteri di inclusione ed esclusione per limitare i fattori di confondimento che avrebbero potuto influenzare il profilo ormonale delle pazienti. I protocolli di stimolazione utilizzati sono stati diversi e personalizzati

per le singole pazienti anche nei dosaggi. Inoltre, si è somministrato in tutti i controlli una supplementazione di progesterone durante la fase luteale. Infine, si è impiegata, sia per i casi che per i controlli, una numerosità ridotta, che ha limitato il potere statistico dello studio.

Le osservazioni, seppur preliminari, del presente studio, sottolineano comunque l'assoluta necessità di valutare in maniera più approfondita l'impatto degli inibitori di aromatasi utilizzati in corso di stimolazione ovarica controllata sui profili ormonali delle pazienti affette da neoplasia della mammella. La nostra esperienza sembra suggerire, in un'ottica di prudenza, la possibilità di privilegiare il *triggering* con Agonisti del GnRH rispetto a quello con HCG. Le conclusioni a cui il nostro lavoro giunge assumono grande importanza, considerando i più recenti studi presenti in letteratura che valutano la ricaduta di alti livelli di progesterone sul rischio e sulla prognosi del carcinoma mammario. Nonostante, infatti, livelli elevati di progesterone siano stati a lungo considerati protettivi nei confronti dello sviluppo di cancro al seno, si è recentemente osservato che importanti fluttuazioni di questo ormone durante i cicli mestruali e/o la gravidanza e l'assunzione di progestinici espongono le donne ad un aumentato rischio neoplastico mammario (Rossouw JE, 2002). Evidenze sempre più forti supportano l'ipotesi che il progesterone sia in grado di espandere la popolazione di cellule staminali del tessuto ghiandolare mammario, sia normale che neoplastico (Hilton HN, 2015). Tra i possibili meccanismi di azione ipotizzati, quello maggiormente supportato consiste nell'attivazione paracrina del recettore del fattore nucleare kappa-B ligando (RANK-L). Tuttavia, le evidenze letterarie relative al possibile ruolo oncogenetico del progesterone non sono ad oggi uniformi (Wang J, 2013) (Axlund SD, 2012), facendo ipotizzare che tale effetto dipenda dalla dose, dalle modalità di somministrazione e, soprattutto, dal tipo di analogo impiegato.

La nostra esperienza sottolinea che, però, essendo le neoplasie mammarie caratterizzate da un alto tasso di recidive, il possibile effetto negativo di alti livelli di progesterone endogeno andrebbe comunque attentamente considerato.

Sono quindi sicuramente necessari studi più ampi per confermare i risultati da noi ottenuti finora e, soprattutto, per comprenderne al meglio le implicazioni cliniche, in modo da garantire anche alle pazienti affette da carcinoma della mammella la piena sicurezza dei protocolli di stimolazione, rispondendo così efficacemente all'esigenza del fondamento della medicina antica e moderna, il "primum non nocere".

BIBLIOGRAFIA

- AIOM. (2018). Linee guida per la preservazione della fertilità nei pazienti oncologici.
- AIOM. (2017-2018). I numeri del cancro in Italia.
- Alviggi C, Cariati F, Conforti A, De Rosa P, Vallone R, Strina I, et al. The effect of FT500 Plus® on ovarian stimulation in PCOS women. *Reproductive Toxicology*. 2016
- Alviggi C., Marci R., Vallone R., Conforti A., Di Rella F., Strina I., Picarelli S., De Rosa P., De Laurentiis M., Yding Andersen C., De Placido G. High progesterone levels during the luteal phase related to the use of an aromatase inhibitor in breast cancer patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017.
- Alviggi C, Conforti A, Rosa PD, Strina I, Palomba S, Vallone R, et al. The distribution of stroma and antral follicles differs between insulin-resistance and hyperandrogenism related polycystic ovarian syndrome. *Frontiers in Endocrinology*. 2017;8.
- Alviggi C, Humaidan P, Howles CM, Tredway D, Hillier SG. Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7:101.
- Amer SA, Smith J, Mahran A, Fox P, Fakis A. Double-blind randomized controlled trial of letrozole versus clomiphene citrate in subfertile women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*. 2017;32:1631-8.
- Bellet M, Gray KP, Francis PA, Lang I, Ciruelos E, Lluch A, et al. Twelve-Month Estrogen Levels in Premenopausal Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Receiving Adjuvant Triptorelin Plus Exemestane or Tamoxifen in the Suppression of Ovarian Function Trial (SOFT): The SOFT-EST Substudy. *J Clin Oncol*. 2016;34:1584-93.

- Blumenfeld Z, Eckman A. Preservation of fertility and ovarian function and minimization of chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women by GnRH-a. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2005; 34:40-43.
- Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:3784-96.
- Chlebowski RT, Pan K, Col NF. Ovarian suppression in combination endocrine adjuvant therapy in premenopausal women with early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;161:185-90.
- Coleman RE, Banks LM, Girgis SI et al. Reversal of skeletal effects of endocrine treatments in the Intergroup Exemestane Study. *2010 Breast Cancer Research and Treatment* 12-4153–161.
- Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, Phil M, Paridaens R, Jassem J, Delozier T, Jones SE, Alvare I, Bertelli G et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. 2004; 3501081–1092.
- Del Mastro L, Ceppi M, Poggio F, Bighin C et al., Gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in cancer women: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Cancer Treat Rev*. 2014 Jun;40(5):675-83.
- Del Mastro L, Rossi G, Lambertini M, Poggio F, Pronzato P New insights on the role of luteinizing hormone releasing hormone agonists in premenopausal early breast cancer patients. *Cancer Treatments Reviews* 42 (2016) : 18-23
- Del Pup L, Peccatori FA. Is ovulation induction with letrozole in breast cancer patients still safe even if it could increase progesterone levels? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Jan;22(1):246-249.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of

randomised trials. 2011 Aug; *Lancet* 27;378(9793):771-84.

Eastell R, Adams J, Clack G, Howell A et al. Long-term effects of anastrozole

- on bone mineral density: 7-year results from the ATAC trial. 2011; *Annals of Oncology* 22:857–862.
- Evans TRJ, Salle E, Di Ornati G, Lassus M, Benedetti MS, Pianezzola E & Coombes RC. Phase I and endocrine study of exemestane, a new aromatase inhibitor, in postmenopausal women. *Cancer Research* 1992 52:5933–5939.
- F.E. van Leeuwen, A.W. van den Belt-Dusebout, J. Benraadt et al. Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer. *The Lancet*, Volume 343, No.8895, p448–452, 19 February 1994.
- Francesco Recchia, Stefano Necozone, Massimo Bratta et al., LH-RH analogues in the treatment of young women with early breast cancer: Long-term follow-up of a phase II study. *International Journal of Oncology* , 2014 Dec;1354-1360.
- Francis PA, Regan MM, Fleming GF, Lang I, Ciruelos E, Bellet M, et al. Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*. 2015;372:436-46.
- Gnant M, Mlineritsch B, Stoeger H, Luschin-Ebengreuth G, Knauer M, Moik M, et al. Zoledronic acid combined with adjuvant endocrine therapy of tamoxifen versus anastrozol plus ovarian function suppression in premenopausal early breast cancer: final analysis of the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 12. *Ann Oncol*. 2015;26:313-20.
- Goldrat O., Gervy C., Englert Y., Delbaere A., Demeestere I. (2015). Progesterone levels in letrozole associated controlled ovarian stimulation for fertility preservation in breast cancer patients. *Hum Reprod*.
- Goss PE, Ingle JN, Pater JL et al. Late extended adjuvant treatment with letrozole improves outcome in women with early-stage breast cancer who complete 5 years of tamoxifen. 2008; *J Clin Oncol*. 20;26(12):1948-55.
- Haas J, Casper RF. In vitro fertilization treatments with the use of clomiphene citrate or letrozole. *Fertil Steril*. 2017;108:568-71.
- Johannessen DC, Engan T, Di Salle E, Zurlo MG, Paolini J, Ornati G, Piscitelli

- G, Kvinnsland S & Lonning PE. Endocrine and clinical effects of exemestane, a novel steroidal aromatase inhibitor, in postmenopausal breast cancer patients: a phase I study. 1997; 31101–1108.
- Jones SE, Cantrell J, Vukelja S et al. Comparison of menopausal symptoms during the first year of adjuvant therapy with either exemestane or tamoxifen in early breast cancer: report of a tamoxifen exemestane adjuvant multicenter trial substudy 2007; *Journal of Oncology* 25 4765–4771.
- Jurg Bernhard, Wixiu Luo, Karin Ribic et al. Patient-reported outcomes with adjuvant exemestane versus tamoxifen in premenopausal women with early breast cancer undergoing ovarian suppression (TEXT and SOFT): a combined analysis of two phase 3 randomized trials. *Lancet Oncol* 2015 16:848-858.
- Kamath MS, Maheshwari A, Bhattacharya S, Lor KY, Gibreel A. Oral medications including clomiphene citrate or aromatase inhibitors with gonadotropins for controlled ovarian stimulation in women undergoing in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;11:Cd008528.
- Kathleen Van Asten¹, Patrick Neven¹, Anneleen Lintermans et al. Aromatase inhibitors in the breast cancer clinic: focus on exemestane. February 1, 2014 21 R31-R49.
- Kiesel L, Runnebaum B. Gonadotropin releasing hormone and analogs Physiology and pharmacology. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 1992; 32:22.
- Linee Guida AIOM 2014, Il follow up.
- Linee Guida AIOM 2018 Preservazione della fertilità in pazienti oncologici.
- Linee Guida AIOM 2017 Terapia ormonale nel carcinoma mammario ormonosensibile.
- Linee Guida AIOM 2017, Neoplasie della mammella.
- Lintermans A, Van Calster B, et al. Aromatase inhibitor-induced loss of grip strength is body mass index dependent: hypothesis-generating findings for its pathogenesis. 2011; *Annals of Oncology* 22-1763–1769.

- Lombardi. Exemestane, a new steroidal aromatase inhibitor of clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1587,2002;326-337.
- Lønning PE, Paridaens R, Thürlimann B, Piscitelli G, di Salle E. Exemestane experience in breast cancer treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997 Apr;61(3-6):151-5.
- Mathew Aju, Davison Nancy E. Adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with hormone-responsive breast cancer. *The Breast* 24 (2015) S120-S125
- Meirow D, Raanani H, Maman E, Paluch-Shimon S, Shapira M, Cohen Y, et al. Tamoxifen co-administration during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization in breast cancer patients increases the safety of fertility-preservation treatment strategies. *Fertil Steril.* 2014;102:488-95 e3.
- Moore HC, Unger JM, Phillips KA et al., Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 2015 Mar 5;372(10):923-32.
- Mortimer JE. Managing the toxicities of the aromatase inhibitors. 2010; *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2256–60.
- N.Zilembo, C. Noberasco, E. Bajetta et al. Endocrinological and clinical evaluation of exemestane, a new steroidal aromatase inhibitor. *British Journal of Cancer* (1995) 72, 1007-1012.
- Oktay K., Hourvitz A., Sahin G., Oktem O., Safro B., Cil A., Bang H. (2006). Letrozole reduces estrogen and gonadotropin exposure in women with breast cancer undergoing ovarian stimulation before chemotherapy. *J Clin Endocrinol Metab.*
- Oktay K, Oktem O, Reh A, Vahdat L. (2006). Measuring the impact of chemotherapy on fertility in women with breast cancer. *J Clin Oncol.*
- Oktay K., Türkçüoğlu I., Rodriguez-Wallberg KA. (2010). GnRH agonist trigger for women with breast cancer undergoing fertility preservation by aromatase inhibitor/FSH stimulation. *Reprod. Biomed. Online.*
- Pagani O, Regan MM, Walley BA, Fleming GF, Colleoni M, Lang I, et al.

- Adjuvant exemestane with ovarian suppression in premenopausal breast cancer. *N Engl J Med.* 2014;371:107-18.
- Paridaens R1, Thomas J, Wildiers J et al. Safety, activity and estrogen inhibition by exemestane in postmenopausal women with advanced breast cancer: a phase I study. *Anticancer Drugs.* 1998 Sep;9(8):675-83.
- Patrick Neven, Ignace Vergote. Should tamoxifen users be screened for endometrial lesions? *The Lancet*, Volume 351, No. 9097, p155–157, 17 January 1998.
- Presant CA, Bosserman L, Young T et al. Aromatase inhibitor-associated arthralgia and/or bone pain: frequency and characterization in non-clinical trial patients. 2007; *Clinical Breast Cancer* 7-775–778.
- Reddy J., Oktay K. (2012). Ovarian stimulation and fertility preservation with the use of aromatase inhibitors in women with breast cancer. *Fertil Steril.*
- Relazione del Ministro della salute al Parlamento sullo stato di attuazione della legge contenente norme in materia di Procreazione Medicalmente Assistita (Legge 19 Febbraio 2004, N40 articolo 15). *Salute* (2014).
- Rienzi L., Cobo A., Paffoni A., Scarduelli C., Capalbo A., Vajta G., Remohí J., Ragni G., Ubaldi FM. (2012). Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl*
- Regan MM, Francis PA, Pagan O et al. Absolute Benefit of Adjuvant Endocrine Therapies for Premenopausal Women With Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Early Breast Cancer: TEXT and SOFT Trials. *J Clin Oncol.* 2016 Jul 1;34(19):2221-31.
- Rivkees AS, Crawford JD. The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage *JAMA* 1988, 259:2123-2125.
- Salazar EL, Paredes A, Calzada L. Endometrial thickness of postmenopausal breast cancer patients treated with tamoxifen. *Gynecol Endocrinol.* 2005 Dec;21(6):312-6.

- Sant M, Allemani C, Berrino F, Coleman MP, Aareleid T, Chaplain G, et al. Breast carcinoma survival in Europe and the United States. *Cancer*. 2004; 100:715-22.
- Scarselli G, Comparetto C, Coccia ME Analoghi agonisti e antagonisti del GnRH Scienze Cliniche Riproduzione Umana cap 147
- Shanafelt TD, Barton DL, Adjei AA & Loprinzi CL. Pathophysiology and treatment of hot flashes. 2002 Mayo Clinic Proceedings 77:1207–1218.
- Sinha S, Kasetta J, Santner SJ, Demers LM, Bremner WJ, Santen RJ. Effect of CGS 20267 on ovarian aromatase and gonadotropin levels in the rat. *Breast Cancer Res Treat* 1998.
- Smith-Bindman R, Kerlikowske K, Feldstein VA et al. Endovaginal ultrasound to exclude endometrial cancer and other endometrial abnormalities. *JAMA*. 1998 Nov 4;280(17):1510-7.
- Sonmezer M, Turkcuoglu I, Coskun U, Oktay K. Random-start controlled ovarian hyperstimulation for emergency fertility preservation in letrozole cycles. *Fertil Steril*. 2011;95:2125. e9-11.
- Tan S-H, Antonio C. Wolff. Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonists in Premenopausal Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 7,455,2007
- Tevaarwerk AJ, Wang M, Zhao F et al. (2014) Phase III comparison of tamoxifen versus tamoxifen plus ovarian function suppression in premenopausal women with node-negative, hormone receptor-positive breast cancer (E-3193, INT-0142): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 32:3948–3958.
- Thijssen JH, Blankenstein MA. Endogenous oestrogens and androgens in normal and malignant endometrial and mammary tissues. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989; 25:1953-1959.
- Vallone R, Buonfantino C, Conforti A, De Rosa P, Cariati F, Picarelli S, et al. An update about oncofertility. *Biochimica Clinica*. 2017; 41:322-34.
- Wiggins DL & Dizon DS. Dyspareunia and vaginal dryness after breast cancer treatment. 2008; *Sexuality, Reproduction and Menopause* 618–22.

Zaman K, Thürlimann B, Huober J *et al.* Bone mineral density in breast cancer patients treated with adjuvant letrozole, tamoxifen, or sequences of letrozole and tamoxifen in the BIG 1–98 study (SAKK 21/07).2012; *Annals of Oncology* 23-1474–1481.

