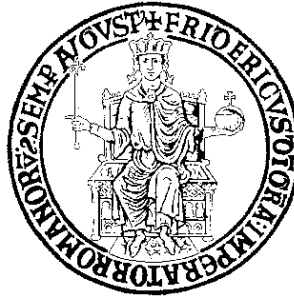


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**Dottorato di ricerca in Sanità Pubblica e Medicina Preventiva XXXV
ciclo**

Coordinatrice Prof.ssa Maria Triassi

**Nuove strategie per la tutela del benessere sessuale e
riproduttivo delle donne**

RELATORE

Ch.mo Prof.
Pierluigi Giampaolino

CANDIDATA

Dott.ssa
Cira Buonfantino

INDICE

INTRODUZIONE4

1. SINDROME GENITO-URINARIA MENOPAUSALE

1.1 Definizione.....	8
1.2 Terapia farmacologica.....	9
1.3 Terapia non farmacologica- laser CO2 microablattivo frazionato.....	10

2. PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ NELLA PAZIENTE ONCOLOGICA

2.1 Aspetti epidemiologici.....	11
2.2 Cause iatrogene di infertilità.....	11
2.3 Strategie di preservazione della fertilità.....	14
2.3.1 Protezione gonadica con Analoghi del GnRH.....	16
2.3.2 Trasposizione ovarica.....	17
2.3.3 Crioconservazione degli embrioni	17
2.3.4 Crioconservazione degli ovociti maturi.....	17
2.3.5 Crioconservazione degli ovociti immaturi e successiva maturazione in vitro.....	19
2.3.6 Crioconservazione del tessuto ovarico.....	20

3. SEZIONE SPERIMENTALE

3.1 Valutazione dei cambiamenti istologici vulvari a seguito di laserterapia CO2 microablattiva frazionata nelle pazienti con sindrome genito-urinaria.....	23
3.1.1 Obiettivi.....	23
3.1.2 Materiali e metodi.....	23

3.1.3	<i>Analisi statistica</i>	26
3.1.4	<i>Risultati</i>	26
3.2	Effetto del laser CO2 microablativo frazionato come terapia di salvataggio per i sintomi e la disfunzione sessuale nelle pazienti affette dal <i>lichen sclerosus</i> vulvare resistente all'uso a lungo termine dei corticosteroidi topici	
3.2.1	<i>Obiettivi</i>	29
3.2.2	<i>Materiali e metodi</i>	29
3.2.3	<i>Analisi statistica</i>	30
3.2.4	<i>Risultati</i>	30
3.3	Utilizzo del <i>pick up</i> ovocitario laparoscopico vs <i>pick up</i> vaginale in alcune categorie di pazienti come strategia di preservazione della fertilità	
3.3.1	<i>Obiettivi</i>	32
3.3.2	<i>Dati preliminari</i>	33
4.	DISCUSSIONE	34
5.	BIBLIOGRAFIA	38

INTRODUZIONE

Il lavoro svolto in questi anni si è incentrato prevalentemente sullo studio delle “nuove strategie per la tutela del benessere sessuale e riproduttivo delle donne”.

Per quanto riguarda il **benessere sessuale** ho rivolto l'attenzione al trattamento della sindrome genito-urinaria menopausale, in passato definita atrofia vulvo-vaginale, che racchiude tutti i segni e sintomi che si sviluppano a carico dell'apparato genitale ed urinario a seguito della deprivazione estrogenica tipica della menopausa. E' necessario, inoltre, fare una precisazione importante: tale sindrome si associa ad un quadro menopausale che può tanto insorgere fisiologicamente (il 50% delle donne con menopausa fisiologica presenta tale sindrome) oppure essere di natura iatrogena quindi può svilupparsi secondariamente ad interventi chirurgici (annessiectomia bilaterale) o a terapie antineoplastiche (il 70% delle donne con menopausa iatrogena da cause oncologiche sviluppa la sindrome) , coinvolgendo dunque una fascia di popolazione con un'età compresa tra i 35 e i 45 anni e che quindi “prematuramente” si trova ad affrontare tale problematica. Nelle pazienti oncologiche la ricaduta sulla qualità di vita è talmente importante che può talvolta determinare un peggioramento sensibile della prognosi *quod vitam* in quanto il 20% delle pazienti con storia di cancro ormono-sensibile rinuncia alla terapia ormonale adiuvante proprio per la comparsa dei sintomi da atrofia vulvovaginale. La mia attività di ricerca è nata da una sensibilità maturata nel corso della mia attività assistenziale. Infatti, la mia attività clinica è rivolta soprattutto alle pazienti oncologiche. L'Università Federico II ed in particolare l'ambulatorio di Oncofertilità è da diversi anni un centro di riferimento regionale per le pazienti con diagnosi oncologica ed in età fertile che desiderino preservare la propria fertilità tramite dei percorsi diagnostico-terapeutici-assistenziali (PDTA) ideati ed attuati in accordo con gli standard italiani ed europei. In tale ottica, oltre alla salvaguardia della salute riproduttiva di queste donne, in collaborazione con l'ambulatorio di Colposcopia, Patologia Cervico-Vaginale e Laserterapia, è stato possibile mettere in atto delle moderne strategie terapeutiche che avessero come obiettivo la preservazione della sessualità, e quindi della qualità di vita, delle pazienti oncologiche che per trattamenti antineoplastici e/o per la terapia ormonale adiuvante sviluppano una menopausa iatrogena con la comparsa di una marcata atrofia vulvovaginale. A queste pazienti, nonché alle pazienti con menopausa fisiologica, viene proposta una terapia innovativa per il trattamento dei sintomi associati alla sindrome genitourinaria menopausale: la laserterapia CO2 microablative frazionata. Da settembre 2015, nell'ambulatorio di Colposcopia, Patologia Cervico-Vaginale del DAI materno-infantile, abbiamo iniziato ad effettuare la laserterapia per i disturbi legati alla sindrome genito-urinaria. Da allora sono stati effettuati più di 700 trattamenti di cui 200 circa

indirizzati a pazienti con menopausa fisiologica o con altre patologie vulvari (es lichen, vulvodinia etc..) e circa 500 alle pazienti oncologiche in menopausa iatrogena. Allo stato la laserterapia CO2 microablative frazionata può ritenersi il *GOLD STANDARD TREATMENT* per i disturbi legati all'atrofia vulvovaginale nelle pazienti oncologiche per cui non è possibile far ricorso ad alcuna terapia farmacologica esistente realmente efficace. Sulla base dei dati ottenuti sul tessuto vaginale, abbiamo cercato di valutare se anche a livello del tessuto vulvare fosse possibile documentare da un punto di vista istologico un cambiamento strutturale che potesse spiegare il miglioramento della sintomatologia. Nel 2020 sono stati pubblicati i risultati della nostra ricerca sulla rivista *Lasers in Surgery and Medicine*.

Considerata l'efficacia del trattamento sia nelle pazienti oncologiche che nelle pazienti con menopausa fisiologica abbiamo iniziato ad ipotizzare l'utilizzo di questa nuova tecnologia anche su altre categorie di pazienti come le pazienti affette da disturbi vulvo-vaginali cronici ed in particolare le pazienti affette da lichen sclero-atrofico vulvare. Il lichen *sclerosus* vulvare è una patologia cronica che colpisce cute e mucose vulvari, ha un' eziologia prevalentemente idiopatica (21.5-34% associato a patologie autoimmunitarie), colpisce soprattutto donne di età superiore ai 50 anni, i sintomi principali sono: bruciore, dispareunia e prurito intenso e si associano ad un importante sovvertimento anatomico vulvare (cute bianca e sottile "a carta di sigaretta", papule e placche di "porcellana bianca", fusione delle labbra, seppellimento del clitoride, interruzione dell'apertura vulvare e riduzione significativa del trofismo vulvare) che di conseguenza comporta un impatto negativo sulla qualità della vita e sulla funzione sessuale, con importanti implicazioni per il benessere psicologico della paziente e implicazioni sulla vita di coppia. La terapia di prima linea in queste pazienti sono i cortisonici topici ultrapotenti (UP-TC) e/o il picrolimus ma esistono delle preoccupazioni circa l'utilizzo a lungo termine di UP-TC che, inducendo l'atrofia vulvare, potrebbero paradossalmente esacerbare i sintomi del lichen *sclerosus* nonché comportare fenomeni di sensibilizzazione da contatto, alterazioni cutanee e/o infezioni secondarie ; inoltre esistono scarse « terapie di salvataggio – *rescue therapy*» per le pazienti che non rispondono agli UP-TC. C. Pertanto, in uno studio pubblicato sulla rivista *Menopause* nel 2020, abbiamo valutato l'efficacia della laserterapia microablative CO2 frazionata in termini di miglioramento della sintomatologia vulvare in pazienti affetti da lichen *sclerosus* vulvare che non hanno risposto alla terapia a lungo termine con i cortisonici topici.

Per quanto riguarda il **benessere riproduttivo**, negli ultimi anni si sta assistendo ad un incremento esponenziale della popolazione di giovani donne "*survivors*" (pazienti che sopravvivono ad una diagnosi di cancro), le quali dovranno confrontarsi con gli effetti

avversi precoci e tardivi delle terapie oncologiche. In tale ottica 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-assistenziali (PDTA) 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 sia nell’offrire strategie di preservazione della fertilità con la possibilità di soddisfare un futuro desiderio di genitorialità, che di garantire un continuo e adeguato *follow up* endocrino-ginecologico per tali pazienti.

Il nostro Centro di Oncofertilità ha effettuato dal 2011 fino ad oggi più di 3000 counselling di preservazione della fertilità ed abbiamo effettuato circa 250 cicli di crioconservazione di gameti e 6 di tessuto ovarico, diventando non solo un centro di riferimento per la regione Campania ma anche del Sud Italia. Data la forte esperienza acquisita, soprattutto nella gestione delle pazienti con neoplasia ormonosensibile e/o ematologiche, che rappresentano la maggioranza delle pazienti afferenti, abbiamo iniziato a sviluppare una particolare sensibilità nella presa in carico della paziente oncologica in senso lato. Sulla base di queste premesse, in questi anni di dottorato abbiamo rivolto l’attenzione alle pazienti oncologiche con storia di tumori ginecologici in cui il principale danno iatrogeno arrecato al loro potenziale riproduttivo è legato prevalentemente al tipo di chirurgia a cui sono sottoposte. In particolare abbiamo osservato che spesso dal territorio ci sono giunte pazienti con storia di tumori ovarici borderline, diagnosticati e trattati conservativamente in età infantile-adolescenziale, a cui però non è stato poi offerto un adeguato counselling circa il pericolo della riduzione del potenziale riproduttivo legato al fatto che spesso tali tumori, nonostante la prognosi favorevole, tendano a recidivare e questo potrebbe comportare il ricorso ad ulteriori interventi che, seppure conservativi, andrebbero ad avere un effetto cumulativo sulla perdita del patrimonio follicolare. In tali pazienti sarebbe sempre necessario offrire un programma di crioconservazione ovocitaria se non è possibile programmare nell’immediato una gravidanza. Inoltre abbiamo osservato che molte pazienti con storia di cancro ovarico ai primi stadi sono state trattate con chirurgia conservativa senza che fosse stata effettuata una

accurata stadiazione chirurgica. Siamo quindi di fronte alla necessità e volontà di offrire a queste pazienti non solo una chance per la preservazione della fertilità ma anche al contempo di garantire un servizio efficace e sicuro per la prognosi oncologica. I dati attuali in letteratura circa l'impatto che cicli di stimolazione ovarica controllata possano avere sul rischio di recidive di tumori ginecologici sono ancora insufficienti ma confortanti in quanto non indicano un incremento del tasso di recidive, soprattutto se consideriamo il ricorso, in corso di stimolazione, al letrozolo che permette di mantenere bassi i livelli di estradiolo come comunemente utilizzato per altre neoplasie ormonosensibili. Se il letrozolo ci consente di minimizzare i "rischi" legati alla stimolazione ovarica abbiamo ipotizzato che in alcune categorie di pazienti potremmo massimizzare la "*safety*" della raccolta ovocitaria proponendo, in casi opportunamente selezionati, un recupero ovocitario per via laparoscopica in alternativa al classico *pick up* ovocitario per via vaginale.

I risultati della nostra attività di ricerca, che è stata quindi rivolta a due filoni paralleli (benessere sessuale e benessere riproduttivo), saranno illustrati nella sezione sperimentale della tesi.

1. SINDROME GENITO-URINARIA MENOPAUSALE

1.1 Definizione

La sindrome genitourinaria della menopausa (*Genitourinary Syndrome of Menopause*, GSM) è definita come un insieme di segni e di sintomi associati alla riduzione degli estrogeni circolanti che determinano cambiamenti a livello vaginale, vulvare, dell'uretra e della vescica (Portman et Gass 2014). La sindrome include:

- sintomi genitali, quali la secchezza vaginale, il bruciore e l'irritazione;
- sintomi della sfera sessuale, come la mancanza di lubrificazione e la dispareunia;
- sintomi urinari: urgenza, disuria e infezioni ricorrenti delle vie urinarie. “Sindrome genitourinaria della menopausa” è pertanto una nuova definizione che comprende sia l'atrofia vulvovaginale sintomatica, sia i sintomi del basso tratto urinario. La precedente definizione di “atrofia vulvovaginale” descriveva invece l'apparenza della vulva e della vagina postmenopausali, senza specificare la presenza dei sintomi associati.

La GSM si manifesta nel 25-50% delle donne in postmenopausa e, contrariamente ai sintomi vasomotori, peggiora invece di migliorare con il trascorrere degli anni. I disturbi diventano evidenti in genere 4-5 anni dopo la menopausa, anche se talora possono manifestarsi più precocemente (Nappi et al, 2012). Tale sindrome compare nel 90% delle donne in menopausa e si associa ad una marcata riduzione della qualità di vita ed è ancora vissuta come un vero e proprio tabù in quanto il 75% delle donne non si rivolge al proprio ginecologo. La GSM è maggiormente riferita dalle donne sessualmente attive ed è uno dei più importanti determinanti della funzione sessuale e della salute uro-genitale, con risvolti significativi sulla qualità di vita. I livelli circolanti di estradiolo nella donna in premenopausa variano tra i 40 e i 400 pg/ml e si riducono a meno di 20 pg/ml dopo la menopausa. L'elevata concentrazione dei recettori per gli estrogeni a livello vaginale, del vestibolo e del trigono vescicale regolano la maturazione e la proliferazione cellulare (Archer 2010).

I cambiamenti anatomici in menopausa includono l'aumentato turnover del collagene, la riduzione dell'elastina, l'aumento del tessuto connettivo e la riduzione del flusso sanguigno a livello vaginale, con conseguente assottigliamento dell'epitelio. Il collagene di tipo III è quello quantitativamente più rappresentato, ed è responsabile delle capacità di flessibilità e distensione; mentre il collagene di tipo I riveste più spiccate proprietà di robustezza. La quota di collagene si riduce con l'aumentare dell'età e con la riduzione del tasso estrogenico. In particolare, si assiste a una variazione del rapporto tra collagene di tipo I e collagene di tipo III, a discapito di quest'ultimo. Le piccole labbra si assottigliano e si riducono di volume, l'introito vaginale si costringe, le caruncole imenali scompaiono e perdono di elasticità, la lubrificazione vaginale diminuisce con conseguente dispareunia. Il meato

uretrale appare prominente rispetto all'introito vaginale ed è vulnerabile ai traumi e alle infezioni. Inoltre, la riduzione degli estrogeni circolanti sembra determinare un incremento nella densità di innervazione sensoriale della vagina. In particolare a livello vestibolare, la fitta rete di terminazioni nervose sensitive subisce un incremento della capacità nocicettiva, non più contrastata dell'effetto di protezione degli estrogeni, configurando una condizione di vestibolodinia secondaria ad atrofia (Griebeling et al, 2012). E' stato, inoltre, evidenziato come l'iperalgia vestibolare ha una matrice neuro-infiammatoria correlata all'incremento di attività mastocitaria, che nel vestibolo delle donne in menopausa appare essere ancora più pronunciato. L'ipoestrogenismo, pertanto, ha effetto patogenetico non solo legato all'alterato trofismo, ma può innescare un'inflammatione sitospecifica vestibolare correlata al dolore (Leclair et al, 2013). Gli estrogeni promuovono inoltre la formazione del glicogeno nell'epitelio squamoso. I lattobacilli di Döderlein, parte della normale flora vaginale, dipendono dal glicogeno come fonte di energia e convertono il glicogeno in acido lattico, mantenendo il pH vaginale acido, fondamentale strumento di difesa dalle infezioni. L'assottigliamento dell'epitelio vaginale determina una riduzione del numero di cellule superficiali glicogenate, con una conseguente alcalinizzazione dell'ambiente vaginale e un aumentato rischio di infezioni urinarie e vaginali. Infatti, il pH vaginale nelle donne in premenopausa è 6.

1.2 Terapia farmacologica

Allo stato, esistono diversi approcci farmacologici per trattare i sintomi della sindrome genito-urinaria menopausale. Sicuramente i farmaci con maggiore profilo di sicurezza sono le terapie topiche a base di gel lubrificanti e/ o sostanze emollienti (es acido ialuronico) che però hanno una efficacia temporanea e moderata, inoltre alcuni prodotti possono interferire con la funzione erettile del partner (es. prodotti a base di lidocaina), avendo paradossalmente una ricaduta negativa sulla vita di coppia. Prodotti molto efficaci sono invece gli estrogeni topici e /o sistemici che però sono controindicati nelle pazienti con storia di neoplasia ormono-sensibile. Un' altra categoria di farmaci molto efficace è quella dei SERM (*selective estrogen receptors modulators*) in primis l'ospemifene. Tale farmaco agisce selettivamente sui recettori estrogenici vulvo-vaginali con attività agonista, mentre presenta azione antagonista a livello mammario e neutra o debolmente agonista a livello endometriale. Non esistono però trials che abbiano valutato la sicurezza del farmaco in pazienti oncologiche (neoplasie ormonosensibili), in corso di terapie antineoplastiche e/o in corso di terapia ormonale adiuvante e dunque allo stato non è possibile definire la possibilità o meno di interazione con altri SERM (es tamoxifene) che sono utilizzati in corso di terapia ormonale

adiuvante. Per questi motivi, l'ospemifene è controindicato in pazienti con cancro in atto o che non hanno ancora terminato la terapia ormonale adiuvante. Un'altra molecola promettente è il prasterone, una molecola biologicamente e biochimicamente identica al deidroepiandrosterone endogeno, che usato topicamente a livello vaginale viene convertito in estrogeni ed androgeni col fine di migliorare la dispareunia; anche in questo caso però, si tratta di un farmaco controindicato nelle pazienti oncologiche in quanto non esistono trials che abbiano valutato in questa categoria di pazienti il profilo di sicurezza soprattutto legato ai dubbi circa la possibilità dell'assorbimento sistemico degli estrogeni applicati topicamente ma anche all'aromatizzazione periferica degli androgeni in estrogeni.

1.3 Terapia non farmacologica- laserterapia CO2 microablative frazionata

La laserterapia CO2 microablative frazionata produce due effetti: una micro-ablazione, tramite un processo di vaporizzazione superficiale, del tessuto atrofico e un effetto termico più profondo che si traduce in una stimolazione della proliferazione di un nuovo epitelio vaginale ricco di glicogeno, neovascolarizzazione e riattivazione dei fibroblasti quiescenti con sintesi di collagene e matrice extracellulare de novo. Questo sul piano clinico-funzionale si traduce nel ripristino del trofismo vulvovaginale, i tessuti risultano più spessi, più elastici e più lubrificati. Il processo di guarigione ha mostrato una prima fase di risposta infiammatoria con comparsa di tessuto di granulazione 1-3 giorni dopo il trattamento, seguita da neocollagenesi progressiva e rimodellamento dermico fino a 30 giorni dopo il trattamento. La neocollagenesi continua in seguito per diversi mesi. Tali cambiamenti strutturali sono stati documentati tramite l'analisi istologica del tessuto vaginale pre e post trattamento grazie a studi pilota messi a punto dal gruppo del Prof. Salvatore dell'IRCCS del San Raffaele di Milano e dal gruppo del Prof. Caligari dell'Università di Pavia nel 2011 e nel 2013. Tali studi hanno dimostrato su campioni biotici un rimodellamento del tessuto vaginale e hanno stabilito il miglior protocollo terapeutico da attuare per giungere a tali cambiamenti istologici. Inoltre nel 2014 il gruppo del Prof. Salvatore ha dimostrato l'efficacia del trattamento effettuato su 72 donne in postmenopausa in cui si è avuto dopo solo 12 settimane di trattamento un miglioramento statisticamente significativo dei sintomi correlati all'atrofia vulvovaginale e della qualità della vita sessuale delle pazienti trattate. Per questi motivi già dal 2014 la FDA (*Food and Drug Administration*) ha autorizzato l'utilizzo della laserterapia CO2 microablative frazionata per il trattamento dei sintomi della atrofia vulvovaginale. Allo stato la laserterapia CO2 microablative frazionata può ritenersi il *GOLD STANDARD TREATMENT* per i disturbi legati all'atrofia vulvovaginale nelle pazienti oncologiche per cui non è possibile far ricorso ad alcuna terapia farmacologica esistente realmente efficace.

2. PRESERVAZIONE DELLA FERTILITA' NELLA PAZIENTE ONCOLOGICA

2.1 Aspetti epidemiologici

Nel 2020 in Italia sono state registrate 377.000 nuove diagnosi di cancro, 182.000 nelle donne (nel 2019 erano, rispettivamente, 175.000), 6.000 casi in più quindi rispetto allo scorso anno (AIOM,2020). Si registra inoltre una riduzione complessiva dei tassi di mortalità stimati nel 2020 rispetto al 2015: sono in diminuzione sia negli uomini (-6%) che nelle donne (-4,2%), grazie ai progressi ottenuti nella diagnosi e nei trattamenti. Nelle donne la sopravvivenza a 5 anni raggiunge il 63%, in gran parte proprio perché nel sesso femminile il tumore più frequentemente diagnosticato è quello della mammella, caratterizzato da una prognosi migliore rispetto ad altre neoplasie. In tale ottica 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. La preservazione della fertilità rappresenta un tema di notevole rilevanza nei pazienti affetti da cancro non soltanto in virtù del miglioramento della sopravvivenza dei tumori in età pediatrica e giovanile, ma anche per il ritardo progressivo dell'età del primo concepimento. Ad eccezione dei casi di sindrome neoplastica ereditaria, dove è opportuno un attento counselling genetico, per entrambi i sessi non sussistono controindicazioni alla genitorialità una volta avvenuta la guarigione dal cancro. Non vi sono infatti evidenze di anomalie congenite o rischio di cancro nella prole di pazienti con storia di tumore.

2.2 Cause iatrogene di infertilità

Le cause iatrogene di infertilità nelle pazienti oncologiche sono:

- trattamenti chemio e /o radioterapici. Comportano una perdita follicolare, probabilmente mediata dalla morte cellulare programmata (apoptosi), e risultano spesso fortemente gonadotossici. È stato dimostrato che i follicoli primordiali risultano più radio/chemioresistenti rispetto a quelli maturi, di conseguenza la gonadotossicità varia rispetto alla fase di crescita follicolare. Le pazienti più giovani sono meno vulnerabili al danno iatrogeno rispetto alle donne in età riproduttiva avanzata, che sono maggiormente predisposte all'esaurimento follicolare precoce. L'effetto causato dai trattamenti chemioterapici può essere suddiviso in un danno diretto a livello dell'ovaio, in un danno vascolare e in un danno cellulare (Ben-Aharon I *et al.*, 2012) (Figura 1). Il danno diretto si

traduce in apoptosi dei follicoli primordiali (PMF), con un danno dose-dipendente, e delle cellule della pregranulosa, danno non dose dipendente. Gli agenti chemioterapici agiscono inoltre causando danni al DNA delle cellule ovcitarie. Tra i vari tipi di danno al DNA, le rotture del DNA a doppio filamento rappresentano le più pericolose. Il danno vascolare indotto da chemioterapici comporta segni di fibrosi nello stroma corticale, con danno a livello dei capillari, riduzione del flusso vascolare e distruzione della parete vascolare. I follicoli primordiali sono sensibili ai cambiamenti dati da una inadeguata vascolarizzazione.

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. Le antracicline anche risultano essere fortemente gonadotossiche. 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 dactinomycin. I dati relativi al rischio da taxani non sono ancora conclusivi (Tabella 2).

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) (Tabella 1).

- terapia endocrina adiuvante. Il tamoxifene è uno dei principali farmaci impiegati nella terapia ormonale adiuvante nelle pazienti con storia di cancro al seno ed è stato dimostrato che comporta un rischio di menopausa precoce in particolare dopo i 45 anni, indipendentemente dalla chemioterapia adoperata.
- Chirurgia ginecologia in età fertile con neoplasie ginecologiche (es tumori ovarici, endometriali e cervice uterina). Quando possibile è necessario preferire nelle pazienti in età riproduttiva trattamenti chirurgici di tipo conservativo rispetto alla chirurgia radicale che potrebbe comportare un depauperamento della riserva follicolare con conseguente impatto negativo sulla fertilità futura. In caso ciò non fosse possibile, in casi selezionati, è opportuno valutare la possibilità di mettere in atto strategie di preservazione della fertilità.

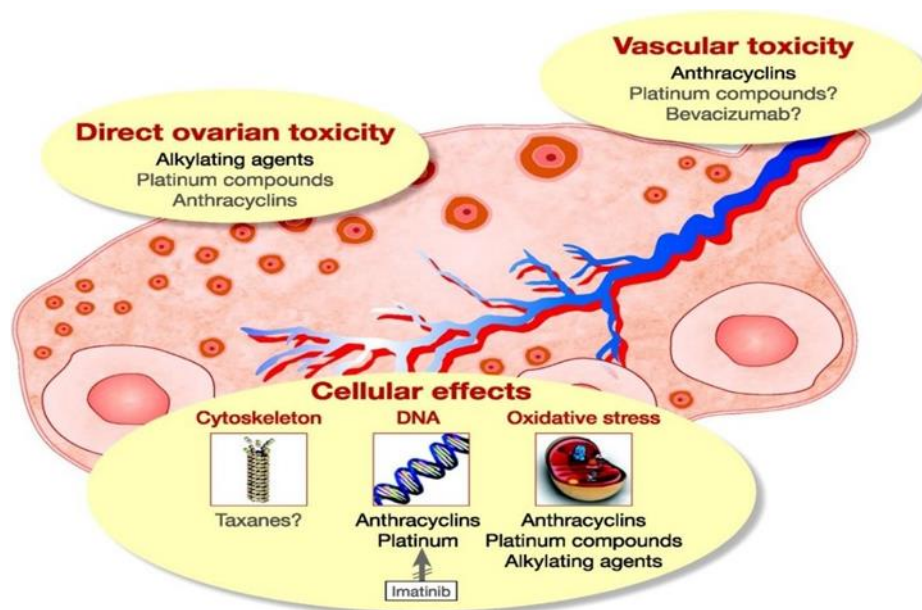


Figura 1 Meccanismi patogenetici di danno ovarico dei diversi agenti chemioterapici

RADIOTERAPIA E DANNO GONADICO
< 600cGy → rischio basso
< 1000 cGy → rischio intermedio
>1000 cGy → rischio alto

Tabella 1. Proporzionalità esistente tra dose di radioterapia e gonadotossicità
(Cittadini E *et al.*, 2007)

Tabella 2

GRADO DEL RISCHIO	TRATTAMENTO
Rischio elevato (> 80%)	-Trapianto di cellule staminali ematopoietiche con ciclofosfamide/irradiazione corporea totale o con ciclofosfamide/busulfano. -Radioterapia esterna che includa nel campo d'irradiazione le ovaie. -CMF, CAF, CEF, 6 cicli in una donna con età > 40 anni.
Rischio intermedio	-CMF, CAF, CEF, per 6 cicli in una donna tra 30 e 39 anni. -AC o EC per 4 cicli in una donna con età $\geq$ 40 anni. -AC o EC a Taxani
Rischio basso (< 20%)	-ABVD (doxorubicina/bleomicina/vinblastina/dacarbazina). -CHOP per 4-6 cicli (ciclofosfamide/doxorubicina/vincristina/prednisone). -CVP (ciclofosfamide/vincristina/prednisone). -AML (antraciline/citarabina). -ALL (polichemioterapia). -CMF, CAF, CEF, 6 cicli in una donna con età < 30 anni. -AC o EC per 4 cicli in una donna di età < 40 anni.
Rischio molto basso o assente	-Vincristina. -Metotrexate. -Fluorouracile.
Rischio sconosciuto	-Oxaliplatino. -Irinotecan. -Anticorpi monoclonali (trastuzumab, bevacizumab, cetuximab). -Inibitori delle tirosino-chinasi (erlotinib, imatinib).

Tabella.1 Rischio di amenorrea permanente nelle donne trattate con chemioterapia e radioterapia (AIOM, 2018)

2.3 Strategie 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 che comprenda e valorizzi il “quesito riproduttivo” col fine di illustrare le migliori strategie disponibili per la preservazione della fertilità 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 (Tabella 3):

- 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 fornito 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 antineoplastico, tipo di patologia neoplastica, 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;
- 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;
- Assenza di malattia disseminate.

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.

2.3.1 Protezione gonadica con analoghi del GnRH

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 pre-adolescenziale 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. 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.

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).

2.3.2 Trasposizione ovarica

La trasposizione chirurgica delle ovaie al di fuori del campo di irradiazione è definita ooforopessi. Tale procedura può essere utilizzata nei casi di irradiazione addominale, sia monolaterale sia bilaterale. Il tasso di successo di questa tecnica viene valutato come preservazione della funzione mestruale a breve termine. Esso varia dal 33% al 91% e ancora non sono chiari gli esiti a lungo termine (AIOM, 2018). Solitamente dopo i 38 anni non è indicato eseguire questo tipo di tecniche (AIOM, 2018).

2.3.3 Crioconservazione degli embrioni

La crioconservazione degli embrioni è la procedura di maggior successo (Lee SJ *et al.*, 2006) ed è quella più applicata nel mondo (Loren AW *et al.*, 2013; *Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology*, 2013). Gli embrioni dopo lo scongelamento hanno potenziale di impianto paragonabile agli embrioni freschi e tale procedura può portare a un tasso di nati vivi del 38.7% (*Society for Assisted Reproductive Technologies*, 2013). Tale procedura non è tuttavia permessa dalla legge italiana (Legge 40/2004).

2.3.4 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 34-36 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 effettuare un "protocollo di emergenza" definito "*random start*" ovvero l'inizio della stimolazione anche in fase follicolare tardiva o 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. E' una condizione temibile e da non sottovalutare in quanto può comportare eccessivo aumento del volume ovarico, versamento pelvi-peritoneale, emocoagulazione 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).

Per donne con tumori ormono-responsivi (mammella, endometrio), sono stati sviluppati approcci alternativi di stimolazione ormonale utilizzando tamoxifene o letrozolo, così da ridurre il rischio potenziale di esposizione ad elevate concentrazioni di estrogeni (Oktay *et al.*, 2005). Le evidenze più recenti dimostrano la sicurezza a lungo termine del letrozolo in quanto non si evidenziano differenze nei tassi di recidiva neoplastica a 5 anni nelle pazienti sottoposte a stimolazione ovarica controllata (controlled ovarian stimulation-COS) sotto letrozolo rispetto ai controlli che non hanno effettuato crioconservazione ovocitaria (Oktay *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2016).

2.3.5 Crioconservazione degli ovociti immaturi e successiva maturazione in vitro

La crioconservazione di ovociti immaturi è una metodica ancora sperimentale (Loren AW *et al.*, 2013; Practice Committee of American Society, 2013). È applicabile soltanto in pochissimi laboratori e per le pazienti per le quali non è possibile procrastinare l'inizio della chemio/radioterapia o in caso di controindicazione all'esecuzione di una stimolazione ovarica controllata. Questa metodica prevede il prelievo di follicoli

immaturi (entro 8°-10° giorno del ciclo) e la successiva maturazione *in vitro* degli ovociti senza la necessità di ricorrere a stimolazione (Oktay *et al.*, 2010).

2.3.6 Crioconservazione del tessuto ovarico

Nel caso di neoplasie ormono-sensibili o quando la paziente non ha possibilità di ritardare eccessivamente la chemioterapia si può optare per la crioconservazione del tessuto ovarico (Partridge *et al.*, 2004). È possibile adoperarla anche nelle bambine e adolescenti prepubere, in quanto a essere crioconservati sono principalmente i follicoli primordiali della corticale ovarica. Con questa metodica sono state ottenute nel mondo più di 100 gravidanze di cui 1 anche in Italia (Revelli *et al.*, 2013; Jensen AK *et al.*, 2017). Controindicazioni assolute sono patologie ad elevato rischio di metastasi ovariche (leucemie, tumori ovarici, tumori solidi metastatici al peritoneo) (AIOM 2018). È una tecnica di rapida esecuzione, finalizzata al congelamento di un elevato numero di follicoli primordiali che, data la loro migliore resistenza all'insulto del congelamento/scongelo rispetto alle cellule mature, sopravvivono in altissima percentuale. Il prelievo è effettuato per via laparoscopica prima dell'inizio del trattamento radio e/o chemioterapico e poi il tessuto è reimpiantato al termine del trattamento. In letteratura sono riportate due metodiche. La prima prevede l'asportazione di almeno il 50% di tessuto ovarico oppure biopsie multiple (5/10) della corticale ovarica con prelievo di frammenti di 5 mm³ (Donnez J *et al.*, 2008). La seconda tecnica, rappresentata dall'asportazione di un ovaio *in toto*, è quella che può garantire migliori probabilità di successo soprattutto in quelle pazienti che effettuano chemioterapia ad alte dosi, irradiazione pelvica o trapianto di midollo osseo (Andersen CY *et al.*, 2008; von Wolff M *et al.*, 2009). Il danno è omogeneamente distribuito all'intera gonade a sostegno della teoria che l'ovariectomia totale possa rappresentare il compromesso migliore per preservare il maggior numero possibile di follicoli primordiali dalla chemio/radio tossicità. I follicoli primordiali possono essere congelati in maniera efficace, ma a causa dell'iniziale ischemia a cui vanno incontro durante il prelievo, un quarto o più di questi follicoli può andare perduto; per questo la quantità di tessuto ovarico da asportare deve essere ampia (Donnez *et al.*, 2018). Dopo il trattamento oncologico, quando la paziente è andata in contro a remissione è possibile reimpiantare il tessuto prelevato. Sono state proposte due tipologie di trapianto del tessuto ovarico: ortotopica ed eterotopica. Nel primo caso, i frammenti, precedentemente congelati, vengono impiantati in corrispondenza di una tasca sottocorticale dell'ovaio residuo, necessariamente controlaterale nel caso di precedente prelievo di ovaio *in toto*. Con tale tecnica è riportata in letteratura una buona

percentuale di ripristino della funzione ovarica e una duratura funzionalità dell'innesto (Sonmezer M *et al.*, 2006; Suzuki M *et al.*, 2015). L'autotrapianto eterotopico può effettuarsi in numerosi siti vascolarizzati diversi dalla sede ovarica originaria: al di sotto della borsa omentale, in corrispondenza di una tasca intraperitoneale, sulla superficie anteriore dell'utero, sulla superficie del muscolo deltoide o del muscolo retto dell'addome (Cittadini E *et al.*, 2007; De vos M *et al.*, 2014). Tuttavia, l'impiego dei siti sottocutanei e intramuscolari non ha portato a risultati validi. Sebbene, infatti, si sia osservato un ripristino della funzione endocrina in una percentuale elevata di casi, non altrettanto incoraggianti sono stati i risultati in termini di tassi di gravidanze. La ripresa della funzionalità endocrina ovarica si ottiene nel 90-100% per circa 5 anni.

Va sottolineato che il principale obiettivo dell'autotrapianto del tessuto ovarico è rappresentato dalla ripresa della fertilità e dall'incremento delle probabilità di concepimento. La comunità scientifica ha, pertanto, focalizzato le proprie attenzioni sulle tecniche di autotrapianto più efficaci al raggiungimento di tale scopo. Di qui la prevalenza di studi in letteratura sui trapianti ortotopici, maggiormente efficaci in tal senso, rispetto agli eterotopici.

Il “*timing*” dell'autotrapianto dovrebbe essere vagliato da un *team* multidisciplinare e discusso con la paziente stessa. Il trapianto può essere attuato più volte in differenti momenti della vita della paziente se non si raggiunge da subito il successo sperato o se si desiderano più gravidanze (Schmidt KL *et al.*, 2005; Jensen AK *et al.*, 2015). Una preoccupazione circa l'autotrapianto di tessuto ovarico nelle pazienti oncologiche è rappresentato dalla potenziale reintroduzione di cellule cancerose (Meirow *et al.*, 2008).

Sebbene alcune recidive potrebbero non essere dovute al trapianto, è indispensabile prevedere un adeguato *screening* preoperatorio per escludere un possibile coinvolgimento ovarico e un'attenta analisi istologica con tutte le metodiche disponibili sui frammenti prima del reimpianto (Hoeckman *et al.*, 2013). Per tale metodica di preservazione della fertilità, i limiti sono rappresentati dalla necessità di sottoporsi a un intervento chirurgico con i rischi a esso connessi, seppur eseguito in laparoscopia, e dalla natura ancora sperimentale della procedura utilizzata soltanto in pochi centri internazionali.

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

Tabella 3

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, e i risultati si sono stabilizzati.	-Richiede 10-14 giorni di stimolazione ovarica; -procedura invasiva per il recupero ovocitario (day surgery o ambulatorio chirurgico).
TECNICA	DEFINIZIONE	COMMENTI	CONSIDERAZIONI
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 o ambulatorio chirurgico).
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 130 bambini.	-ancora sperimentale 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 variabile dal 20 al 100% dei casi 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, 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.

3. SEZIONE SPERIMENTALE

L'attività di ricerca del dottorato è stata dunque improntata su due filoni di ricerca:

- strategie per la tutela del benessere sessuale delle donne
- strategie per la tutela del benessere riproduttivo delle donne

Benessere sessuale:

- 1) valutare se anche a livello del tessuto vulvare il laser Co2 microablativo frazionato determina cambiamenti istologici di natura strutturale che possano spiegare il miglioramento della sintomatologia.
- 2) valutare l'utilizzo di questa nuova tecnologia anche su altre categorie di pazienti come le pazienti affette da disturbi vulvo-vaginali cronici ed in particolare le pazienti affette da lichen sclero-atrofico.

Benessere riproduttivo:

Valutare l'utilizzo e l'efficacia del *pick up* ovocitario laparoscopico vs *pick up* vaginale in alcune categorie di pazienti come strategia di preservazione di fertilità

3.1 VALUTAZIONE DEI CAMBIAMENTI ISTOLOGICI VULVARI A SEGUITO DI LASERTERAPIA MICROABLATIVA CO2 FRAZIONATA NELLE PAZIENTI CON LA SINDROME GENITO-URINARIA

3.1.1 Obiettivi

Il laser CO2 frazionato è stato proposto come trattamento efficace per la sindrome genito-urinaria menopausale (GSM). Tuttavia, gli effetti del trattamento laser sul tessuto vulvare non sono mai stati valutati. Il nostro obiettivo è stato quello di valutare i cambiamenti istologici correlati al laser CO2 frazionato nel tessuto vulvare nelle pazienti con la GSM.

3.1.2 Materiali e metodi

Lo studio è stato progettato come uno studio osservazionale prospettico di coorte-singolo centro. Abbiamo arruolato le donne in post-menopausa con GSM e che avevano soddisfatto i criteri di inclusione del protocollo di studio che afferivano all'ambulatorio di colposcopia e laserterapia del Dipartimento Materno Infantile dell'A.O.U. Federico II dal luglio 2017 ad Ottobre 2018. Le pazienti arruolate sono state sottoposte a tre applicazioni ambulatoriali vulvovaginali di laser CO2 microablativo frazionato (ogni 4 settimane) e biopsia vulvare prima e dopo il trattamento. I cambiamenti istologici vulvari, l'aspetto vulvare e vaginale e i

sintomi della GSM sono stati valutati pre- e post-trattamento così come il dolore correlato alla procedura ad ogni applicazione laser e la soddisfazione generale della paziente dopo il trattamento.

I criteri di inclusione sono stati:

- (1) sintomi di GSM, come ridotta sensibilità durante rapporti sessuali, vulvodinia, secchezza vulvovaginale bruciore/prurito vulvovaginale, perdite vaginali, dispareunia e/o disuria;
- (2) età >50 anni;
- (3) assenza di mestruazioni per ≥ 12 mesi;
- (4) non rispondere/essere insoddisfatto delle precedenti terapie topiche estrogeniche.

I criteri di esclusione erano:

- (1) uso di qualsiasi terapia ormonale sostitutiva (sia sistemica o locale) entro i 6 mesi precedenti l'inclusione nello studio;
- (2) uso di creme idratanti, lubrificanti o qualsiasi preparazione locale entro i 30 giorni precedenti l'inclusione nello studio;
- (3) infezioni del tratto urinario acute o ricorrenti;
- (4) infezioni genitali attive (ad esempio, herpes genitalis, candida);
- (5) prolasso in stadio $\geq$ II;
- (6) precedente chirurgia pelvica ricostruttiva;
- (7) qualsiasi malattia grave o condizione cronica che potrebbe interferire con la compliance allo studio;
- (8) disturbi psichiatrici che precludono il consenso informato.

Outcomes primari e secondari:

L'*outcome* primario è stato il tasso di rimodellamento del tessuto connettivo vulvare dopo il trattamento laser a confronto con l'aspetto istologico del tessuto vulvare prima del trattamento.

Gli *outcomes* secondari sono stati:

- (1) il tasso di miglioramento del trofismo dell'epitelio vulvare dopo il trattamento laser a confronto con l'aspetto istologico del tessuto vulvare prima del trattamento;
- (2) il tasso di neovascolarizzazione nel connettivo vulvare dopo il trattamento laser a confronto con l'aspetto istologico del tessuto vulvare prima del trattamento;
- (3) la differenza tra le medie del *Vulva Health Index* (VuHI) dopo il trattamento laser rispetto al basale;

- (4) la differenza tra le medie del *Vaginal Health Index* (VHU) dopo il trattamento laser rispetto al basale;
- (5) la differenza tra le medie dell'intensità di ciascun sintomo della GSM dopo il trattamento laser rispetto al basale;
- (6) la media del grado di dolore causato da ciascuna singola applicazione laser;
- (7) il tasso di soddisfazione generale delle pazienti al trattamento.

È stato definito il rimodellamento del tessuto connettivo vulvare come l'aumento del pattern reticolare del connettivo vulvare valutato su colorazione con ematossilina-eosina nelle sezioni dei campioni istologici.

Il miglioramento del trofismo dell'epitelio vulvare è stato definito come il ripristino almeno parziale della normale architettura e spessore dell'epitelio vulvare rispetto le alterazioni relative al GSM (assottigliamento, appiattimento e/o ipercheratosi).

La neovascolarizzazione nel tessuto connettivo vulvare era definita come un aumento del numero di vasi nella parte profonda tessuto connettivo rispetto allo stato di pretrattamento. Un aumento di almeno il 25% è stato considerato significativo.

L'intensità dei sintomi GSM è stata misurata utilizzando una scala analogica visiva (VAS). Il grado di dolore causato dal laser è stato valutato utilizzando una VAS. Il grado di soddisfazione complessivo è stato valutato rispondendo alla seguente domanda: "Prendendo in considerazione le variazioni dei sintomi della GSM, anche il benessere generale e la qualità della vita, come gli effetti avversi sperimentati, se ce ne sono, come definiresti il livello di soddisfazione per il trattamento laser?" Le risposte dei pazienti sono state valutate su una scala Likert a 5 punti (molto soddisfatto, soddisfatto, incerto, insoddisfatto e molto insoddisfatto). La soddisfazione per il trattamento è stata definita quando le risposte erano "molto soddisfatto" o "soddisfatto".

Il trattamento è stato eseguito con il Laser CO2 microablativo frazionato. Il tessuto vaginale è stato trattato utilizzando la seguente impostazione: *dot power* 30W, *dwell time* 1000 microsecondi, distanza tra i punti 1000 µm e lo *smart stack* da 1 a 3. Il trattamento laser è stato erogato attraverso una sonda vaginale che è stata inserita lentamente e ruotata lungo il canale vaginale. I genitali esterni erano stati trattati utilizzando la seguente impostazione: *dot power* 24W, *dwell time* 1000 microsecondi, distanza tra i punti 700 µm e *smart stack* da 1 a 3. Prima di iniziare il trattamento è stata applicata crema anestetica, il cui eccesso era rimosso prima di iniziare il trattamento. Il trattamento laser comprendeva tre applicazioni (ogni 4 settimane) in regime ambulatoriale.

La biopsia vulvare è stata convenzionalmente eseguita nella zona tra l'introito e il piccolo labbro di sinistra, per evitare *bias* dell'operatore e ridurre l'*intra-* e *inter-*variabilità selezionando aree con diverso stato atrofico.

Lo studio ha ricevuto l'approvazione del Comitato Etico dell'Università degli Studi di Napoli Federico II ed è stato eseguito in conformità con la Dichiarazione di Helsinki. Tutti i pazienti arruolati hanno firmato un consenso informato e scritto e i loro dati sono stati resi anonimi.

3.1.3 Analisi statistiche

Il tasso di cambiamenti istologici (cioè, rimodellamento del tessuto connettivo vulvare, miglioramento del trofismo dell'epitelio vulvare e neovascolarizzazione) è stato calcolato come rapporto tra il numero degli eventi e il numero totale di pazienti.

Gli intervalli e le medie $\pm$ deviazione standard (SD) sono state calcolate per i punteggi VuHI, VHI e VAS al basale (T0), dopo il primo (T1), il secondo (T2) e il terzo (T3) ciclo laser. L'analisi univariata tra variabili continue è stata eseguita utilizzando il t-test per campioni appaiati con errore α di 0,05. Un'analisi dei dati *post-hoc* delle variabili dicotomiche è stata aggiunta come "*intention-to-treat*" per evitare gli effetti del *drop-out*. Visto l'*outcome* primario e la mancanza di precedenti dati in letteratura, un calcolo della dimensione del campione non era possibile eseguirlo pertanto abbiamo definito a priori di arruolare 20 pazienti nello studio.

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando *Statistical Package for Social Science* (SPSS) 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3.1.4 Risultati

Popolazione di studio

Come previsto, 20 pazienti sono stati arruolati nello studio.

Diciotto pazienti sono stati sottoposti a tutte le applicazioni laser e 15 sono state sottoposte a biopsia vulvare pre- e post-trattamento; i restanti pazienti sono stati persi al follow-up. L'età media era di $58,7 \pm 6,6$ anni e il BMI medio era di $24,5 \pm 3$ kg/m².

Gli intervalli e le medie $\pm$ SD dei punteggi di VHI, VuHI e VAS al T0 e T3 sono stati riportati rispettivamente nella tabella 4.

Outcomes primari e secondari:

Su 15 pazienti che sono state sottoposte alle biopsie vulvari il tasso di rimodellamento del connettivo vulvare dopo il trattamento laser era del 93,3% (14 su 15 pazienti). I tassi di miglioramento del trofismo dell'epitelio vulvare e di neovascolarizzazione del connettivo

vulvare dopo il trattamento laser erano l'80% (12 pazienti su 15) e 86,7% (13 pazienti su 15), rispettivamente (Fig. 2 e 3).

Tra T3 e T0, le differenze nelle medie di VuHI e VHI erano di $-8,3 \pm 1,6$ e $5,3 \pm 1,5$ punti ($P < 0,001$), rispettivamente (Tabella 4).

Tra T3 e T0, la differenza nelle medie dei punteggi VAS era $-3,8 \pm 2,1$ ($P < 0,0001$) per la ridotta sensibilità durante i rapporti sessuali, $-3,1 \pm 4,2$ ($P = 0,006$) per vulvodinia, $-4,7 \pm 2,5$ ($P < 0,0001$) per secchezza vaginale, $-3,7 \pm 3,4$ ($P < 0,0001$) per bruciore/prurito vulvovaginale, $-1,4 \pm 2,1$ ($P = 0,011$) per perdite vaginali, $-4,6 \pm 1,6$ ($P < 0,0001$) per dispareunia, $-2,6 \pm 2,6$ punti ($P < 0,0001$) per disuria (Tabella 4).

Le medie $\pm$ DS del grado di dolore correlato alla procedura erano $4,4 \pm 0,9$ a T1, $3,7 \pm 1,6$ a T2 e $2,9 \pm 1,9$ a T3 (Tabella 4).

Il tasso di pazienti con soddisfazione generale per il trattamento è stato del 72,2%.

Analisi “*Intention-to-treat post hoc*”

Il tasso di rimodellamento del tessuto connettivo vulvare dopo il trattamento laser è stato del 70% (14 su 20 pazienti). Il tasso di miglioramento del trofismo dell'epitelio vulvare e della neovascolarizzazione nel tessuto connettivo vulvare dopo il laser sono stati del 60% (12 su 20 pazienti) e del 65% (13 su 20 pazienti), rispettivamente.

Tab 4

TABLE 2. Means $\pm$ SD of VHI, VuHI, GSM Symptoms and Procedure-Related Pain in the Enrolled Patients

ITEM (mean $\pm$ SD)	T_0	T_1	T_2	T_3	Δ_{T3-T0} (P value)
VuHI	11.5 ± 1.9	8.2 ± 1.5	3.9 ± 1.6	3.2 ± 1.1	-8.3 ± 1.6 (<0.0001)
VHI	14.6 ± 1.5	16.8 ± 1.3	19.1 ± 1	19.9 ± 1	5.3 ± 1.5 (<0.0001)
Bulging feeling	2.1 ± 2.9	1.9 ± 2.4	1.6 ± 2.1	0.6 ± 1.2	-1.5 ± 2.1 (0.009)
Reduced sensitivity during sexual intercourse	7.4 ± 2.2	5.7 ± 2.9	4.5 ± 2.8	3.6 ± 2.3	-3.8 ± 2.1 (<0.0001)
Vulvodinia	4.2 ± 4.4	2.4 ± 2.9	2.5 ± 2.5	1.1 ± 1.5	-3.1 ± 4.2 (0.006)
Vaginal dryness	8.9 ± 1.5	7.3 ± 1.7	5.3 ± 2.4	4.2 ± 1.9	-4.7 ± 2.5 (<0.0001)
Vulvovaginal burning/itching	5.9 ± 4	4.1 ± 3.7	2.8 ± 2.7	2.3 ± 2.1	-3.7 ± 3.4 (<0.0001)
Vaginal discharge	2.4 ± 3.2	1.8 ± 3.3	1.3 ± 2.1	0.9 ± 1.4	-1.4 ± 2.1 (0.011)
Dyspareunia	8.6 ± 1.3	6.8 ± 2.9	5.4 ± 2.7	4.1 ± 2.2	-4.6 ± 1.6 (<0.0001)
Dysuria	3.4 ± 3.3	2.5 ± 3.4	1.1 ± 1.7	0.8 ± 1.1	-2.6 ± 2.6 (<0.0001)
Procedure-related pain	–	44.3 ± 8.8	36.8 ± 16.1	28.9 ± 18.8	–

Fig2-3

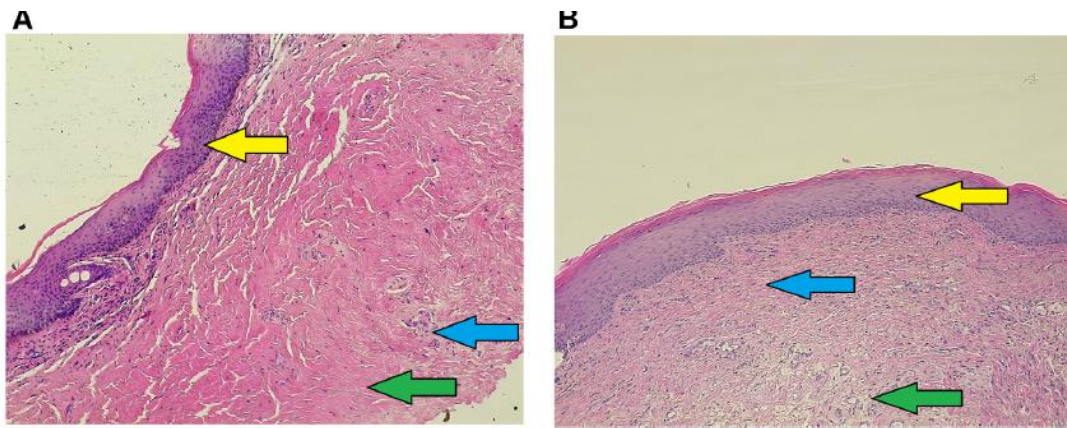


Fig. 1. (A) and (B) Pretreatment biopsies (magnification $\times 100$): vulvar epithelium was thin and flat (yellow arrows); connective tissue was fibrotic (i.e., dense and homogenous, green arrows); only rare blood vessels were observed in the deep connective (blue arrows).

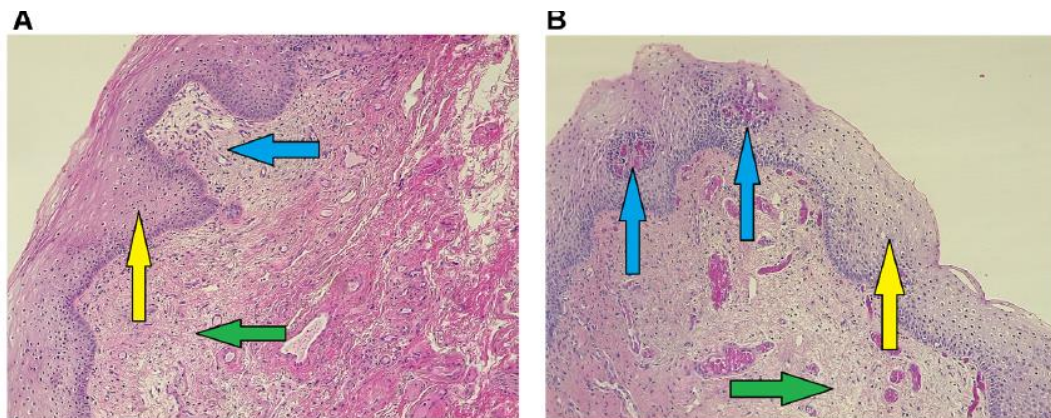


Fig. 2. (A) and (B) In post-treatment biopsies (magnification $\times 100$), the thickness and architecture of vulvar epithelium were restored (yellow arrows); connective tissue showed restored architecture (i.e., reticular disposition of collagen fibrils) and hydration (i.e., looser pattern) (green arrows); a proliferation of blood vessels was observed in the subepithelial connective (blue arrows).

3.2 EFFETTO DEL LASER CO2 MICROABLATIVO FRAZIONATO COME TERAPIA DI SALVATAGGIO PER I SINTOMI E LA DISFUNZIONE SESSUALE NELLE DONNE AFFETTE DA LICHEN VULVARE *SCLEROSUS* RESISTENTE ALL'USO A LUNGO TERMINE DI CORTICOSTEROIDI TOPICI

3.2.1 *Obiettivi*

L'obiettivo di questo studio è stato valutare l'efficacia della terapia laser CO2 microablativa frazionata come terapia di “salvataggio” nelle donne con sintomi gravi e disfunzione sessuale correlata al lichen *sclerosus* vulvare non responsivo al trattamento a lungo termine con corticosteroidi topici ultra potenti.

3.2.2 *Materiali e metodi*

La popolazione dello studio è stata selezionata tra tutte le donne con diagnosi di lichen *sclerosus* vulvare che sono afferite all'ambulatorio di colposcopia e laserterapia del Dipartimento Materno Infantile dell'Università degli Studi di Napoli Federico II tra il 1° dicembre 2017 e il 1° maggio 2019 che hanno ricevuto il trattamento laser CO2 microablativo frazionato dopo fallimento con il trattamento a lungo termine con clobetasolo propionato (pomata allo 0,05%, applicato localmente ogni notte per 4 settimane e successivamente a notti alterne per 4 settimane).

Sono state considerate refrattarie alla terapia con i corticosteroidi topici ultrapotenti le pazienti che non hanno segnalato nessuno miglioramento dei sintomi e nelle quali all'esame obiettivo vulvare non è stato evidenziato nessun segno di miglioramento dopo almeno quattro cicli di trattamento. Prima del reclutamento, tutte le donne sono state sottoposte a visita ginecologica e tutte avevano un pap test negativo negli ultimi 3 anni. Abbiamo incluso solo le donne di età superiore ai 35 anni in cui la diagnosi di lichen *sclerosus* era stata confermata dall'esame istologico. Abbiamo deciso di escludere le donne che avevano subito qualsiasi tipo di terapia ormonale post-menopausale o trattamento contraccettivo per almeno 1 anno prima della procedura per evitare *bias*. Abbiamo anche escluso le donne con tumore maligno concomitante e lesioni non maligne del tratto genitale inferiore, nonché pazienti con immunodeficienza congenita/acquisita.

Ogni applicazione di laser CO2 frazionato microablativo è stata effettuata con un intervallo di 30 o 40 giorni. Il trattamento delle regioni vulvari è stato effettuato senza sedazione e anestesia locale alle seguenti impostazioni: potenza 25 W, unità di tempo di scansione 1000 ms, distanza tra i punti 700 mm e lo *smart stack* da 1 a 3. Il trattamento vaginale nelle donne

in menopausa è stato effettuato secondo le seguenti impostazioni: sono potenza 30 W, tempo di scansione 1000 ms, distanza tra i punti 1000 mm e lo *smart stack* da 1 a 3.

In ciascuna paziente è stata effettuata una visita ginecologica prima dell'inizio del trattamento e 3 mesi dopo ogni ciclo di trattamento (*follow-up* mediano di 5 mesi). Tutte le procedure sono state eseguite dallo stesso operatore. Abbiamo valutato i sintomi più comuni del lichen *sclerosus* e la tollerabilità al trattamento laser utilizzando una scala visiva analogica (VAS).

L'*outcome* primario era il prurito vulvare.

Gli *outcomes* secondari erano la dispareunia superficiale (dolore all' introito durante il rapporto), secchezza vulvare, vulvodinia, ridotta sensibilità durante il rapporto e tollerabilità del laser (dolore durante l'applicazione e/o il movimento della sonda e dolore associato all'applicazione del laser). Sono stati valutati anche sintomi legati alla menopausa, come disuria, lassità vaginale e perdite vaginali.

Data la natura osservazionale dello studio, non è stato soggetto ad approvazione da parte del comitato etico. Tutti i partecipanti hanno dato il loro consenso informato scritto allo studio. Questo studio è conforme ai principi incarnati nella Dichiarazione di Helsinki.

3.2.3 Analisi statistica

In questo studio abbiamo confrontato i dati dallo stesso individuo in momenti diversi, in modo che ogni paziente fungesse da controllo di sé stesso. In dettaglio, la mediana e i range interquartili dei punteggi VAS per ogni sintomo correlato al lichen, correlato alla procedura ed alla menopausa sono stati calcolati durante la prima visita e dopo il completamento di ciascuno dei due trattamenti. Il test ANOVA di *Friedman* è stato usato per valutare le differenze tra le mediane dei punteggi VAS per ciascun sintomo durante il trattamento. È stato effettuato anche il confronto a coppie tra i cicli di trattamento. I risultati sono stati analizzati utilizzando SPSS 22.0 per Windows (*Statistical Package for Social Science*, IBM, New York). Un valore $P < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

3.2.4 Risultati

Un totale di 100 pazienti con lichen *sclerosus* vulvare sono stati valutate. Quaranta soddisfacevano i criteri di ammissibilità allo studio.

La maggior parte era in menopausa (37/40). Tutte le donne hanno firmato il consenso informato. Nessuna delle pazienti arruolate nello studio ha riportato qualche manifestazione allergica ai corticosteroidi durante il trattamento precedente. L'età media della popolazione era di $57,9 \pm 11,1$ anni. Come riportato in Tabella 5, al T0, le donne arruolate nello studio

avevano sintomi severi correlati al lichen come prurito vulvare (Punteggio VAS mediano 8, intervallo interquartile 7-9), secchezza vulvare (Punteggio VAS mediano 8, intervallo interquartile 8-9), dispareunia superficiale (punteggio VAS mediano 9, intervallo interquartile 7-10) e ridotta sensibilità durante i rapporti sessuali (punteggio VAS mediano 6, intervallo interquartile 3-9).

Dopo il completamento del trattamento, si è evidenziato un miglioramento statisticamente significativo del prurito vulvare, secchezza vulvare, dispareunia superficiale e migliore sensibilità durante i rapporti sessuali (Tabella 5). E' stato evidenziato in corso di *follow up* un miglioramento del prurito vulvare dopo il primo ciclo di trattamento rispetto al T0 e un'ulteriore miglioramento è stato registrato dopo il completamento del secondo ciclo ($P<0,001$). Allo stesso modo per i sintomi come secchezza vulvare, sensibilità durante i rapporti e la dispareunia superficiale è stato evidenziato un miglioramento dopo due cicli di trattamento (Tabella 5). Nessun vantaggio apprezzabile è stato osservato in termini di vulvodinia ($P=0.22$). Per ciò che concerne il dolore correlato al movimento della sonda e all'applicazione del laser al T0 erano bassi e non si evidenzia un cambiamento statisticamente significativo al termine del trattamento. Nessun paziente ha riportato qualsiasi effetto avverso sistemico o locale durante o dopo il completamento del trattamento laser.

Tab 5

TABLE 1. Median visual analog scale scores of lichen sclerosis-related symptoms at baseline (T0) and after two cycles of laser treatment (T1 and T2)

Lichen sclerosis-related symptoms	T0 (n = 40) (VAS range 0-10)		T1 (n = 40) (VAS range 0-10)		T2 (n = 40) (VAS range 0-10)		T0 vs T1 vs T2 <i>P</i> ^a	T0 vs T1 <i>P</i> ^a	T0 vs T2 <i>P</i> ^a	T1 vs T2 <i>P</i> ^a
	Median	Interquartile range	Median	Interquartile range	Median	Interquartile range				
Vulvar itching	8	7-9	6	5-6	3	1-4	<0.001	0.037	<0.001	0.01
Vulvar dryness	8	8-9	7	5-7	3	1-5	<0.001	NS	<0.001	0.01
Superficial dyspareunia	9	7-10	7	5-8	3	2-6	<0.001	0.037	<0.001	0.002
Reduced sensitivity during intercourse	6	3-9	4	1.75-7	2	0-3.25	<0.001	NS	<0.001	0.025
Vulvodynia	0	0-7	1	0-5	1	0-3	0.22	NS	NS	NS

Menopause-related symptoms	T0 (n = 37) (VAS range 0-10)		T1 (n = 37) (VAS range 0-10)		T2 (n = 37) (VAS range 0-10)		T0 vs T1 vs T2 <i>P</i> ^a	T0 vs T1 <i>P</i> ^a	T0 vs T2 <i>P</i> ^a	T1 vs T2 <i>P</i> ^a
	Median	Interquartile range	Median	Interquartile range	Median	Interquartile range				
Vaginal laxity	0	0-1	0	0-3	0	0-2	0.038	NS	0.02	0.04
Dysuria	1	0-5	0	0-7	0	0-3	0.01	NS	0.04	0.05
Vaginal discharge	1	0-3	1	0-3	0	0-3	0.034	NS	0.04	NS

NS, not significant; VAS, visual analog scale.

^aFriedman ANOVA test.

3.3 UTILIZZO DEL *PICK UP* OVOCITARIO LAPAROSCOPICO VS *PICK UP* VAGINALE IN ALCUNE CATEGORIE DI PAZIENTI COME TECNICA DI PRESERVAZIONE DELLA FERTILITA'

3.3.1 Obiettivi

Abbiamo ipotizzato che in alcune categorie di pazienti potremmo massimizzare la “*safety*” della raccolta ovocitaria proponendo, in casi opportunamente selezionati, un recupero ovocitario per via laparoscopica in alternativa al classico *pick up* ovocitario per via vaginale. Questo potrebbe essere utile alle:

- a) pazienti con storia di tumore ovarico- *borderline* (stadi iniziali) o tumore ovarico maligno epiteliale (stadi iniziali IA con chirurgia stadiativa ottimale e istologia favorevole – IC con interessamento ovarico unilaterale e istologia favorevole) , a cui non è stata effettuata nel corso dei pregressi interventi chirurgici un’accurata stadiazione chirurgica, in quanto offriremo in un unico tempo chirurgico: 1) la possibilità di recuperare gli ovociti 2) minimizzare il rischio di *spillage* - disseminazione di eventuali cellule tumorali nel cavo addomino-pelvico - tramite l’utilizzo di una *endobag* 3) effettuare un *second look* laparoscopico che potrebbe permettere di evidenziare aree sospette da sottoporre a biopsie mirate associate a *washing* peritoneale per l’esame citologico, garantendo così un adeguato *follow up* oncologico delle pazienti.
- b) pazienti con tumore vaginale e tumore cervicale cervicale (stadi FIGO IA1-2, IB1, II A con linfonodi negativi) il cui accesso per via transvaginale può associarsi idealmente ad un minimo rischio di *spillage*, non trascurando il fatto che in pazienti con un tumore vaginale l’accesso vaginale di per sé può risultare estremamente difficoltoso.
- c) patologie annessiali benigne (teratoma maturo, cisti dermoidi *et similia*) candidate ad intervento chirurgico→*unico tempo chirurgico*

Il nostro studio avrebbe dunque come obiettivo primario valutare l’efficacia della laparoscopia (vs *pick up* ovocitario vaginale) in termini di numero di ovociti recuperati e numero di ovociti maturi rispetto a quelli attesi sulla base della riserva ovarica di partenza delle pazienti (calcolata sull’integrazione della conta dei follicoli antrali e il valore dell’ormone antimulleriano), nonché di valutare la sicurezza della procedura intesa come numero ed entità di complicanze postoperatorie e numero di giorni di degenza (motivo di

non trascurabile importanza nell'ottica di continuare a garantire alle pazienti un rapido accesso alle terapie antineoplastiche).

3.3.2 Dati preliminari

Purtroppo a causa della pandemia mondiale COVID 19, molte pazienti candidate a questo tipo di intervento hanno preferito rimandare la procedura e solo nel 2022 siamo ripartiti con il reclutamento dei casi.

Ad oggi sono stati effettuati 4 *pick up* ovocitari laparoscopici come mostrato in tabella 6.

I casi su cui vale la pena soffermarsi sono due.

- 1) Paziente con diagnosi di cancro vaginale. Abbiamo recuperato e congelato un numero adeguato di ovociti sulla base della riserva ovarica della paziente e dell'età, quindi ottenendo una efficacia paragonabile al *pick up* per via vaginale ma soprattutto abbiamo offerto alla paziente, che dopo qualche giorno è stata sottoposta a chemioterapia, la possibilità di preservare la sua fertilità grazie alla tecnica laparoscopica cosa che non sarebbe stato possibile con il prelievo vaginale, in quanto la paziente non era accessibile per tale via data la massa locale (anche l'intero monitoraggio ecografico è avvenuto per via trans addominale).
- 2) Paziente con cisti dermoide. La paziente aveva un unico annesso-ov sinistro (pregressa *exeresi* dell'altro annesso per cistoadenoma mucinoso ed endometrioma); anche in tal caso abbiamo avuto un recupero adeguato e anche più efficiente rispetto al *pick* vaginale in quanto per l'intero monitoraggio ecografico non sono mai stati evidenziate formazioni follicolari (a causa della cisti che inglobava completamente il parenchima ovarico) e quindi la laparoscopia al momento del *pick up* ci ha permesso di visualizzare *in vivo* i follicoli che si erano formati per poter aspirare gli ovociti cosa che sarebbe stata quantomeno più indaginosa con l'accesso per via transvaginale

Negli altri due casi il recupero non è stato ottimale ma questo non è ascrivibile al prelievo in laparoscopia in quanto nella paziente con cancro ovarico *borderline* è stata la risposta alla stimolazione a non essere adeguata rispetto a quella attesa e nella paziente con diagnosi di teratoma il risultato è stato in linea con la scarsa riserva ovarica della paziente.

Tab 6

Patologia	Età	AMH ng/ml	AFC n°	n° ov prelevati	n° ov M2	gg degenza	Complicanze	gg t antineopla stiche
K vagina	35	1,84	9	8	8	3	0	2
Cisti dermoide	31	1,08	-	6	6	3	0	-
K ov borderline	22	1,33	10	1	1	3	0	-
Teratoma maturo	26	0,12	-	1	1	3	0	-

4 DISCUSSIONE

Circa il benessere sessuale ci siamo concentrati sulla possibilità di offrire una terapia innovativa e sicura per il trattamento dei disturbi vulvovaginali: la laserterapia microablattiva CO2 frazionata. *In primis*, abbiamo dimostrato che il trattamento con il laser CO2 microablattivo porta a cambiamenti istologici anche a livello del tessuto vulvare oltre che i già noti effetti a livello vaginale. In particolare, si assiste ad un rimodellamento del tessuto connettivo con il ripristino della normale architettura delle fibrille di collagene, neovascolarizzazione e miglioramento del trofismo epiteliale del tessuto vulvare nelle pazienti con GSM. Questi cambiamenti istologici spiegherebbero il miglioramento significativo nei VuHI, VHI e nei sintomi riferiti dalle pazienti. Inoltre, la maggior parte delle pazienti mostra un elevato livello di soddisfazione generale per il trattamento con riduzione del dolore legato all'esecuzione del trattamento, il dolore infatti diminuisce con l'aumentare del numero delle applicazioni. Ad oggi, questo è il primo studio che valuta i cambiamenti istologici legati all'utilizzo del laser CO2 microablattivo frazionato sul tessuto vulvare di pazienti con GSM. Inoltre, questo studio potrebbe essere il primo studio istologico ad avere un *design* prospettico. Inoltre, il numero delle pazienti reclutate è apparso relativamente alto rispetto agli altri studi istologici effettuati in pazienti con GSM. I cambiamenti istologici osservati nel tessuto vulvare sembrano caratterizzati da una

riattivazione e un rimodellamento tissutale simile a quelli riportati per il tessuto vaginale e la cute valutati negli studi presenti in letteratura. I cambiamenti istologici osservati nel tessuto vulvare successivi al trattamento laser sembrano infatti mostrare un “ringiovanimento” rendendo il tessuto vulvare più simile a quello delle donne in premenopausa. In particolare, vi è una riattivazione dei fibroblasti con produzione di nuovi componenti molecolari della matrice del tessuto connettivo, neocollagenesi e restauro dell'architettura trabecolare del collagene. I cambiamenti nel connettivo sono accompagnati da cambiamenti nell'epitelio vulvare, con restauro della sua normale architettura e spessore. In questo modo, il tessuto vulvare così “restaurato” potrebbe essere più sensibile all'attività ormonale ovarica residua della menopausa consentendo una migliore diffusione degli ormoni nei tessuti e ciò potrebbe portare a un effetto a lungo termine del trattamento laser sui tessuti, evitando la terapia ormonale e i conseguenti effetti collaterali per le pazienti con GSM, specialmente in pazienti ad alto rischio come le pazienti oncologiche verso cui mostriamo una particolare sensibilità legata all'esperienza maturata nel centro di Oncofertilità; ulteriori studi a lungo termine di *follow-up* sono incoraggiati a questo proposito.

Clinicamente, i cambiamenti istologici osservati sono stati accompagnati da un significativo miglioramento dei VuHI, VHI e della sintomatologia tipica della GSM sin dalla prima applicazione laser, tale miglioramento cresce ad ogni applicazione laser ed è accompagnato da una diminuzione del dolore legato alla procedura. Il miglioramento statisticamente significativo del VuHI rende il laser CO2 microablativo frazionato una terapia efficace per i sintomi e segni vulvari della GSM, analogamente a come è stato confermato per i sintomi vaginali negli studi presenti in letteratura. Infine, dato che nessuna paziente ha mostrato peggioramenti istologici e/o di sintomi e/o segni della GSM, questo studio permette di stabilire il miglior protocollo, efficace e sicuro, per il trattamento sul tessuto vulvare. Allo stato non esistono studi che abbiano confrontato gli effetti istologici del laser CO2 frazionato e degli estrogeni locali, che al momento restano la terapia farmacologica principale per la GSM, sul tessuto vulvovaginale. In effetti, la maggior parte studi hanno valutato gli effetti degli estrogeni locali sulla vagina piuttosto che dell'epitelio vulvare e si basavano su dati citologici piuttosto che reperti istologici. Auspichiamo che altri studi possano essere incoraggiati in questa direzione.

Abbiamo poi cercato di dimostrare che il laser CO2 microablativo frazionato potrebbe essere utilizzato per alleviare la maggior parte dei sintomi correlati al lichen *sclerosus* nelle donne refrattarie agli UP-TC, che sono considerati i farmaci di prima linea per questa condizione. Il sollievo dei sintomi ha avuto un miglioramento statisticamente significativo solo dopo due cicli di trattamento, non si sono verificati effetti avversi e la procedura è stata ben tollerata. Il

meccanismo d'azione del trattamento laser CO2 nelle lesioni da lichen non è chiaro. Questa procedura induce l'ablazione dell'epidermide e del derma superficiale, di conseguenza, è possibile che il trattamento laser CO2 possa ridurre l'ipercheratosi delle lesioni e migliorare i processi di riparazione e riepitelizzazione. I nostri risultati indicano che il laser CO2 microablativo frazionato migliora significativamente i sintomi correlati al lichen e potrebbe quindi essere considerato una strategia di salvataggio per le pazienti affette da lichen e che hanno una compromissione del loro benessere sessuale. Inoltre, considerando che la terapia steroidea non è esente da effetti collaterali e che il laser offre un notevole profilo di sicurezza, sarebbe auspicabile effettuare grandi studi prospettici randomizzati che possano confrontare le due strategie terapeutiche.

Tuttavia, riconosciamo che il nostro studio è limitato da un design non randomizzato, la piccola dimensione campionaria e la mancanza di un controllo non trattato, o in alternativa, l'uso di controlli trattati con altri tipi di laser. Un altro limite del nostro studio è il breve follow-up, di conseguenza, non abbiamo dati circa l'effetto a lungo termine della CO2 microablativa frazionata e se siano necessari ulteriori cicli di trattamento per un effetto duraturo.

L'attività di ricerca rivolta all'utilizzo di nuove strategie per la tutela del benessere riproduttivo è tutt'ora *in itinere* ed è stata indirizzata alla possibilità di offrire i pick up ovocitari per via laparoscopica in alcune categorie di pazienti che ne beneficerebbero rispetto al "classico" prelievo per via transvaginale. Abbiamo rivolto l'attenzione alle pazienti oncologiche con storia di tumori ginecologici in cui il principale danno iatrogeno arrecato al loro potenziale riproduttivo è legato prevalentemente al tipo di chirurgia a cui sono sottoposte.

In particolare abbiamo osservato che spesso dal territorio ci sono giunte pazienti con storia di tumori ovarici borderline, diagnosticati e trattati conservativamente in età infantile-adolescenziale, a cui però non è stato poi offerto un adeguato counselling circa il pericolo della riduzione del potenziale riproduttivo legato al fatto che spesso tali tumori, nonostante la prognosi favorevole, tendano a recidivare e questo potrebbe comportare il ricorso ad ulteriori interventi che, seppure conservativi, andrebbero ad avere un effetto cumulativo sulla perdita del patrimonio follicolare. In tali pazienti sarebbe sempre necessario offrire un programma di crioconservazione ovocitaria se non è possibile programmare nell'immediato una gravidanza. Inoltre abbiamo osservato che molte pazienti con storia di cancro ovarico ai primi stadi sono state trattate con chirurgia conservativa senza che fosse stata effettuata una accurata stadiazione chirurgica. Siamo quindi di fronte alla necessità e volontà di offrire a

queste pazienti non solo una chance per la preservazione della fertilità ma anche al contempo di garantire un servizio efficace e sicuro per la prognosi oncologica.

Allo stato siamo consci della scarsa casistica ma tale criticità è da ascrivere alla rarità di alcune patologie (es k vagina), agli stretti criteri di inclusione per partecipare ai programmi di fertility sparing e preservazione della fertilità (es stadi tumorali iniziali) e al periodo pandemico intercorso. Nonostante ciò, crediamo sia un filone di ricerca da perseguire; *in primis* perché siamo una struttura di III livello a cui inevitabilmente afferiranno sempre più casi di tale portata e a cui ci sentiamo di dover dare risposta nell'ottica della più recente *tailored* medicine, soprattutto perché si tratta di pazienti giovani in età fertile e quindi di un problema sanitario ad elevato impatto sociale; *in secundis* perché allo stato non ci sono studi in letteratura se non di *pick up* effettuati per via laparoscopica o su animali o *ex vivo* e quindi crediamo sia giusto incrementare le conoscenze e offrire nuovi spunti di ricerca.

BIBLIOGRAFIA

- ACOG Practice Bulletin No. 83: diagnosis and management of vulvar skin disorders. *Obstet Gynecol* 2008;111:1243-1253.
- Agarwal, A., Said, T.M., 2004. Implications of systemic malignancies on human fertility. *Reprod. Biomed. Online* 9, 673–679.
- AIOM. (2020). Linee guida per la preservazione della fertilità nei pazienti oncologici.
- AIOM. (2019). I numeri del cancro in Italia.
- Almog, B., Azem, F., Gordon, D., Pauzner, D., Amit, A., Barkan, G., Levin, I., 2012. Effects of cancer on ovarian response in controlled ovarian stimulation for fertility preservation. *Fertil. Steril.* 98, 957–960.
- Al-Inany HG, Youssef MA, Ayeleke RO, Brown J, LamWS, Broekmans FJ 2016 Cochrane. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. Al-Inany HG, Youssef MA, Ayeleke RO, Brown J, LamWS, Broekmans FJ 2016 Cochrane.
- Alvarez, R.M., Ramanathan, P., 2016. Fertility preservation in female oncology patients: the influence of the type of cancer on ovarian stimulation response. *Hum. Reprod.* [Epub ahead of print].
- Alviggi, Conforti, Buonfantino, Vallone, De Rosa, Strina, De Placido. Capitolo “Induzione della crescita follicolare multipla e ovulazione” Libro *Biologia e Tecnologia della Riproduzione Umana*, edito da Piccin nel gennaio 2019
- Alviggi C, Humaidan P, Howles CM, Tredway D, Hillier SG. Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009 Sep 22;7:101. doi: 10.1186/1477-7827-7-101. Review.
- Anderson RA, Themmen AP, Al-Qahtani A, Groome NP, Cameron DA. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Hum Reprod* 2006;21:2583–2592.
- Andersen CY, Rosendahl M, Byskov AG, et al. Two successful pregnancies following autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Human Reproduction* 2008;23:2266–72.
- ASRM. (2013). Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine & Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertility and Sterility*.
- Astolfi P, Zonta LA. Delayed maternity and risk at delivery. *Paediatric and perinatal epidemiology*

2002;16(1):67-72

- Ataya K., Rao LV., Lawrence E., Kimmel R. (1995). Luteinizing hormone releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biol Reprod.*
- Bar-Joseph H, Ben-Aharon I, Rizel S, Stemmer SM, Tzabari M & Shalgi R Doxorubicin-induced apoptosis in germinal vesicle oocytes *Reproductive Toxicology*, 2010 Dec;30(4):566-72
- Barnhart K, Osheroff J. Follicle stimulating hormone as a predictor of fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998;10:227–32.
- Bath LE., Critchley HO., Chambers SE., Anderson RA., Kelnar CJ., Wallace WH. (1999). Ovarian and uterine characteristics after total body irradiation in childhood and adolescence: response to sex steroid replacement. *Br J Obstet Gynaecol.*
- Bénard, J., Calvo, J., Comtet, M., Benoit, A., Sifer, C., Grynberg, M., 2016. Fertility preservation in women of the childbearing age: indications and strategies]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* 45, 424– 444.
- Vittoria Benini¹, Alessandro Ferdinando Ruffolo¹, Arianna Casiraghi¹, Rebecca S Degliuomini¹, Matteo Frigerio², Andrea Braga³, Maurizio Serati⁴, Marco Torella⁵, Massimo Candiani¹, Stefano Salvatore¹. New Innovations for the Treatment of Vulvovaginal Atrophy: An Up-to-Date Review. *Medicina (Kaunas)* 2022 Jun 6;58(6):770. doi: 10.3390/medicina58060770
- Bines J., Oleske DM., Cobleigh MA. (1996). Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J. Clin. Oncol.*
- Blumenfeld Z., Eckman A. (2005). Preservation of fertility and ovarian function and minimization of chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women by GnRH-a. *J Natl Cancer Inst Monogr.*
- Bonadonna G., Valagussa P. (1985). Adjuvant systemic therapy for resectable breast cancer. *J. Clin. Oncol.*
- Brewer M., Gershenson DM., Herzog CE., Mitchell MF., Silva EG., Wharton JT. (1999). Outcome and reproductive function after chemotherapy for ovarian dysgerminoma. *J Clin Oncol.*
- Byrne J., Fears TR., Gail MH., Pee D., Connelly RR., Austin DF., Holmes GF., Holmes FF., Latourette HB., Meigs JW., et al. (1992). Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence. *Am J Obstet Gynecol.*
- Cao YX., Xing Q., Li L., Cong L., Zhang ZG., Wei ZL., Zhou P. (2009). Comparison of

survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slowfreezing and vitrification. *Fertil. Steril.*

- Chang, M.Y., Chiang, C.H., Hsieh, T.T., Soong, Y.K., Hsu, K.H., 1998b. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril.* 69, 505–510.
- Chen SU., Yang YS. (2009). Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwan J Obstet Gynecol.*
- Chi CC, Kirtschig G, Baldo M, Brackenbury F, Lewis F, Wojnarowska F. Topical interventions for genital lichen sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2011. CD008240. 12.
- Chi CC, Kirtschig G, Baldo M, Lewis F, Wang SH, Wojnarowska F. Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on topical interventions for genital lichen sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 2012;67:305-312. 13. Renaud-Vilmer C, C Cittadini E., Barraco G., Benigno M. (2007). Strategie e tecniche per la preservazione della fertilità nel paziente oncologico. Cofese Edizioni.
- Cobo, A., Meseguer, M., Remohí, J., Pellicer, A., 2010. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum. Reprod.* 25, 2239–2246.
- Cobo, A., Serra, V., Garrido, N., Olmo, I., Pellicer, A., Remohí, J., 2014. Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes. *Fertil. Steril.* 102, 1006–1015.
- Del Mastro L., Ceppi M., Poggio F., Bighin C., Peccatori F., Demeestere I., Levaggi A., Giraudi S., Lambertini M., D'Alonzo A., Canavese G., Pronzato P., Bruzzi P. (2014). 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.*
- De Vos M, Smits J, Woodruff TK. Fertility preservation in women with cancer. *Lancet* 2014;384:1302-10
- Domingo, J., Guillén, V., Ayllón, Y., Martínez, M., Muñoz, E., Pellicer, A., Garcia-Velasco, J.A., 2012. Ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation in cancer patients is diminished even before oncological treatment. *Fertil. Steril.* 97, 930–934.
- Donnez J, Manavella DD, Dolmans M-M. Techniques for ovarian tissue transplantation and results. *Minerva Ginecologica.* 2018 Aug;70(4):424- 431

- Donnez J, Squifflet J, Van Eyks As, et al. Restoration of ovarian fuction in orthotopically transplanted cryopreserved ovarian tissue: a pilot experience. *Reprod Biomed Online* 2008;16:694-704.
- Duffy CM., Allen SM., Clark MA. (2005). Discussions regarding reproductive health for young women with breast cancer undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol*.
- Ebbel E, Katz A, Kao N, Cedars M. Reproductive aged women with cancer have a lower antral follicle count than expected. *Fertil Steril* 2011;96:S199–S200.
- ESHRE Guidelines 2016.
- Fisher B., Dignam J., Mamounas EP., Costantino JP., Wickerham DL., Redmond C., Wolmark N., Dimitrov NV., Bowman DM., Glass AG., Atkins JN., Abramson N., Sutherland CM., Aron BS., Margolese RG. (1996). Sequential methotrexate and fluorouracil for the treatment of node-negative breast cancer patients with estrogen receptor-negative tumors. *J. Clin. Oncol*.
- Fleischer RT., Vollenhoven BJ., Weston GC. (2011). The effects of chemotherapy and radiotherapy on fertility in premenopausal women. *Obstet. Gynecol. Surv*.
- Friedler, S., Koc, O., Gidoni, Y., Raziel, A., Ron-El, R., 2012. Ovarian response to stimulation for fertility preservation in women with malignant disease: a systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril*. 97, 125–133.
- Goodwin PJ., Ennis M., Pritchard KI., Trudeau M., Hood N. (1999). Risk of menopause during the first year after breast cancer diagnosis. *J. Clin. Oncol*.
- Hagen CP, Sorensen K, Anderson RA, Juul A. Serum levels of antimullerian hormone in early maturing girls before, during, after suppression with GnRH agonist. *Fertil Steril* 2012;98:1326–1330.
- Hoekman EJ, Smit VTHBM, Fleming TP, Louwe LA, Fleuren GJ, Hilders Searching for metastases in ovarian tissue before autotransplantation: a tailor-made approach CGJM.. *Fertility and Sterility*, February 2015 Volume 103, Issue 2, Pages 469–477
- Hudson MM. Reproductive outcomes for survivors of childhood cancer. *Obstetrics and gynecology* 2010;116(5):1171-83
- Humaidan P., Quartarolo J., Papanikolaou EG.(2010). Preventing ovarian hyperstimulation syndrome: guidance for the clinician. *Fertil. Steril*.
- Huser M., Crha I., Ventruba P., Hudecek R., Zakova J., Smardova L., Kral Z., Jarkovsky J. (2008). Prevention of ovarian function damage by a GnRH analogue during chemotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Hum Reprod*.
- Iannaccone AM, Verrusio G, Iurassich S. Female lichen sclerosus genitalis: discomfort and adaptation. *Clin Ter* 2016;167:113-120.

- Institut National du Cancer. Epidémiologie des cancers. 2017. www.e-cancer.fr. Accessed 1 July 2017.
- Irit Ben-Aharon and Ruth Shalgi, Petah-Tiqva, Israel, What lies behind chemotherapy-induced ovarian toxicity? *Reproduction*, Aug 2012, Page(s): 153–163 Volume/Issue: Volume 144 2010;93:855–64
- Jensen AK, Kristensen SG, Macklon KT, et al. Outcomes of transplantations of cryopreserved ovarian tissue to 41 women in Denmark. *Hum Reprod* 2015;30:2838-45.
- Jensen AK, Macklon KT, Fedder J, Ernst E, Humaidan P, Andersen CY. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2017;34(3):325-36
- Jonat W., Kaufmann M., Sauerbrei W., Blamey R., Cuzick J., Namer M., Fogelman I., de Haes JC., de Matteis A., Stewart A., Eiermann W., Szakolczai I., Palmer M., Schumacher M., Geberth M., Lisboa B. (2002). Goserelin versus cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil as adjuvant therapy in premenopausal patients with node-positive breast cancer: The Zoladex Early Breast Cancer Research Association Study. *J. Clin. Oncol.*
- Justice HM., Counselman FL., (2008). Ovarian hyperstimulation syndrome: an important complication of in vitro fertilization.. *Am. J. Emerg. Med.*
- Kim CH., Jeon GH. (2012). Fertility preservation in female cancer patients. *ISRN Obstetrics and Gynecology*.
- Kim J, Turan V, Oktay K. Long-Term Safety of Letrozole and Gonadotropin Stimulation for Fertility Preservation in Women With Breast Cancer, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2016 Apr;101(4):1364-71
- Klock, S.C., Zhang, J.X., Kazer, R.R., 2010. Fertility preservation for female cancer patients: early clinical experience. *Fertil. Steril.* 94, 149–155.
- Knopman, J.M., Noyes, N., Talebian, S., Krey, L.C., Grifo, J.A., Licciardi, F., 2009. Women with cancer undergoing ART for fertility preservation: a cohort study of their response to exogenous gonadotropins. *Fertil. Steril.* 91 (Suppl. 4), 1476–1478.
- Lawrenz B, Fehm T, von Wolff M, Soekler M, Huebner S, Henes J, Henes M. Reduced pretreatment ovarian reserve in premenopausal female patients with Hodgkin lymphoma or non-Hodgkin-lymphoma—evaluation by using antimüllerian hormone and retrieved oocytes. *Fertil Steril* 2012;98:141–144.

- Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, et al. American recommendations on fertility preservation in cancer patients. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006;24(18):2917-31
- LEE A, LIM A, FISCHER G. FRACTIONAL CARBON DIOXIDE LASER IN RECALCITRANT VULVAL LICHEN SCLEROSUS. *AUSTRALAS J DERMATOL* 2016;57:39-43.
- Levi Setti PE., Porcu E., Patrizio P., Vigiliano V., de Luca R., d'Aloja P., Spoletini R., Scaravelli G. (2014). Human oocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry data, 2007-2011. *Fertil. Steril.*
- Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31(19):2500-10
- Lushbaugh CC., Casarett GW. (1976). The effects of gonadal irradiation in clinical radiation therapy: A review. *Cancer.*
- Meirow D, Hardan I, Dor J, Fridman E, Elizur S, Ra'anani H, Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients et al.. *Human Reproduction*, 2008 May;23(5):1007-13.
- Meirow D., Lewis H., Nugent D., Epstein M. (1999). Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum Reprod.*
- Meirow D., Nugent D. (2001). The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update*
- Michaen, N., Ben-David, G., Ben-Yosef, D., Almog, B., Many, A., Pauzner, D., Lessing, J.B., Amit, A., Azem, F., 2010. Ovarian stimulation and emergency in vitro fertilization for fertility preservation in cancer patients. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 149, 175–177.
- Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. (2012) How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Human Reproduction.*
- Murina Semiologia del dolore vulvare e diagnosi clinica in post menopausa, dopo tumori e cause iatrogene 2017 Fondazione Graziottin
- Nair PA. Vulvar lichen sclerosus et atrophicus. *J Midlife Health* 2017;8:55-62.
- Nelson SM, Telfer EE, Anderson RA. The ageing ovary and uterus: new biological insights. *Hum Reprod Update* 2013;19:67–83.
- Noyes, N., Porcu, E., Borini, A., 2009. Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod. Biomed. Online* 18, 769–776.

- Noyes, N., Labella, P.A., Grifo, J., Knopman, J.M., 2010. Oocyte cryopreservation: a feasible fertility preservation option for reproductive age cancer survivors. *J. Assist. Reprod. Genet.* 27, 495–499.
- Ogilvy-Stuart AL., Shalet SM. (1993). Effect of radiation on the human reproductive system. *Environ Health Perspect.*
- Oktay K, Buyuk E, Libertella N, Akar M, Rosenwaks Z. Fertility preservation in breast cancer patients: a prospective controlled comparison of ovarian stimulation with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. *J Clin Oncol.* 2005 Jul 1;23(19):4347-53. Epub 2005 Apr 11.
- 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., 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.*
- Origoni M. Fractional carbon dioxide laser in recalcitrant vulvar lichen sclerosus. *Australas J Dermatol* 2017;58:e157-e158.
- Pagano T, De Rosa P, Vallone R, et al. Fractional microablative CO2 laser in breast cancer survivors affected by iatrogenic vulvovaginal atrophy after failure of nonestrogenic local treatments: a retrospective study. *Menopause* 2018;25:657-662.
- Pagano T, De Rosa P, Vallone R, et al. Fractional microablative CO2 laser for vulvovaginal atrophy in women treated with chemotherapy and/or hormonal therapy for breast cancer: a retrospective study. *Menopause* 2016;23:1108-1113.
- Paradisi, R., Vicenti, R., Macciocca, M., Seracchioli, R., Rossi, S., Fabbri, R., 2016. High cytokine expression and reduced ovarian reserve in patients with Hodgkin lymphoma or non-Hodgkin lymphoma. *Fertil. Steril.* 106, 1176–1182.
- Paramanantham J., Talmor AJ., Osianlis T., Weston GC. (2015). Cryopreserved oocytes: update on clinical applications and success rates. *Obstet. Gynecol. Surv.*
- Partridge AH, Gelber S, Peppercorn J, Sampson E, Knudsen K, Laufer M, et al. Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004;22(20):4174-83
- Pavone, M.E., Hirshfeld-Cytron, J., Lawson, A.K., Smith, K., Kazer, R., Klock, S., 2014. Fertility preservation outcomes may differ by cancer diagnosis. *J. Hum. Reprod. Sci.* 7, 111–118.

- Peccatori FA, Azim HA, Jr., Orecchia R, Hoekstra HJ, Pavlidis N, Kesic V, et al. Cancer, pregnancy and fertility: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 2013;24
- Powell JJ, Wojnarowska F. Lichen sclerosus. *Lancet* 1999;353:1777- 1783.
- Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology, 2013. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil. Steril.* 99, 37–43.
- Quintero, R.B., Helmer, A., Huang, J.Q., Westphal, L.M., 2010. Ovarian stimulation for fertility preservation in patients with cancer. *Fertil. Steril.* 93, 865–868.
- Revelli A, Marchino G, Dolfin E, Molinari E, Delle Piane L, Salvagno F, Live birth after orthotopic grafting of autologous cryopreserved ovarian tissue and spontaneous conception in Italy et al. *Fertility and Sterility*, January 2013 Volume 99, Issue 1, Pages 227– 230
- 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.*
- Rivkees SA., Crawford JD. (1988). The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage. *JAMA*.
- Robertson, A.D., Missmer, S.A., Ginsburg, E.S., 2011. Embryo yield after in vitro fertilization in women undergoing embryo banking for fertility preservation before chemotherapy. *Fertil. Steril.* 95, 588–591.
- S Salvatore¹, R E Nappi, M Parma, R Chionna, F Lagona, N Zerbinati, S Ferrero, M Origoni, M Candiani, U Leone Roberti Maggiore. Sexual function after fractional microablative CO₂ laser in women with vulvovaginal atrophy. *Climacteric* Apr;18(2):219-25. doi: 10.3109/13697137.2014.975197. Epub 2014 Dec 16.
- Stefano Salvatore¹, Umberto Leone Roberti Maggiore, Stavros Athanasiou, Massimo Origoni, Massimo Candiani, Alberto Calligaro, Nicola Zerbinati. Histological study on the effects of microablative fractional CO₂ laser on atrophic vaginal tissue: an ex vivo study. *Menopause* 2015 Aug;22(8):845-9. doi: 10.1097/GME.0000000000000401
- Sanders JE., Buckner CD., Amos D., Levy W., Appelbaum FR., Doney K., Storb R., Sullivan KM., Witherspoon RP., Thomas ED. (1988). Ovarian function following marrow transplantation for aplastic anemia or leukemia. *J Clin Oncol.*
- Schenker, J.G., Meirow, D., Schenker, E., 1992. Stress and human reproduction. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 45, 1–8.

- Simon B., Lee SJ., Partridge AH., Runowicz CD. (2005). Preserving fertility after cancer. CA. Cancer J. Clin.
- Smith GD., Serafini PC., Fioravanti J., Yadid I., Coslovsky M., Hassun P., Alegretti JR., Motta EL. (2010). Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. Fertil. Steril
- Somigliana E., Peccatori FA., Filippi F., Martinelli F., Raspagliesi F., Martinelli I. (2014). Risk of thrombosis in women with malignancies undergoing ovarian stimulation for fertility preservation. Hum. Reprod. Update.
- Sonmezer M., Oktay. (2006). Fertility Preservation in Young Women Undergoing Breast Cancer Therapy. Oncologist.
- Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, et al. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). Fertil Steril 2001;76:874–8.
- Schilsky RL., Sherins RJ., Hubbard SM., Wesley MN., Young RC., DeVita VT. (1981). Long-term follow up of ovarian function in women treated with MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease. Am J Med.
- Schmidt KL, Andersen CY, Loft A, et al. Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. Hum Reprod 2005;20:3539–46.
- Schover LR. Patient attitudes toward fertility preservation. Pediatric blood & cancer 2009;53(2):281-4
- Su HI, Flatt SW, Natarajan L, DeMichele A, Steiner AZ. Impact of breast cancer on anti-mullerian hormone levels in young women. Breast Cancer Res Treat 2013a; 137:571–577.
- SuHI, Maas K, Sluss PM, Chang RJ, Hall JE, Joffe H. The impact of depot GnRH agonist on AMH levels in healthy reproductive-aged women. J Clin Endocrinol Metab 2013b; 98:E1961–6.
- Tangir J., Zelterman D., Ma W., Schwartz PE. (2003). Reproductive function after conservative surgery and chemotherapy for malignant germ cell tumors of the ovary. Obstet Gynecol.
- Teinturier C., Hartmann O., Valteau-Couanet D., Benhamou E., Bougneres PF. (1998). Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: high-dose busulfan is a major cause of ovarian failure. Bone Marrow Transplant.
- Vallone R, Buonfantino C, Conforti A, De Rosa P, Cariati F, Picarelli S, Caggiano F, Spadarella E, Tomaiuolo R, Alviggi C, De Placido G. An update about oncofertility. 2018
- van der Kaaij MA, Heutte N, Meijnders P, Abeillard-Lemoisson E, Spina M, Moser LC, et al. Parenthood in survivors of Hodgkin lymphoma: an EORTC-GELA general population case-control study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of

Clinical Oncology 2012;30(31):3854-63

- van Dorp W, van den Heuvel-Eibrink MM, de Vries AC, Pluijm SM, Visser JA, Pieters R, Laven JS. Decreased serum anti-Mullerian hormone levels in girls with newly diagnosed cancer. Hum Reprod 2014;29:337–342.
- Von Wolff M, Donnez J, Hovatta O, et al. Cryopreservation and autotransplantation of human ovarian tissue prior to cytotoxic therapy--a technique in its infancy but already successful in fertility preservation. Eur J Cancer 2009;45:1547-53.
- Wallace WH., Shalet SM., Crowne EC. (1989). Gonadal dysfunction due to cis-platinum. Med Pediatr Oncol.
- Wallace WH., Thomson AB., Kelsey TW. (2003). The radiosensitivity of the human oocyte. Hum Reprod.
- Wallace WH., Thomson AB., Saran F., Kelsey TW. (2005). Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. Int J Radiat Oncol Biol Phys.
- Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. PLoS One 2010;5:e8772.
- Wo JY., Viswanathan AN. (2009). Impact of radiotherapy on fertility, pregnancy, and neonatal outcomes in female cancer patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys.