

Cristina Fabiani

**PROCREAZIONE
MEDICALMENTE ASSISTITA:
FARMACI, PROTOCOLLI DI
STIMOLAZIONE
E TECNICHE DI
FECONDAZIONE ASSISTITA**



Procreazione medicalmente assistita: farmaci, protocolli di stimolazione e tecniche di fecondazione assistita

Cristina Fabiani

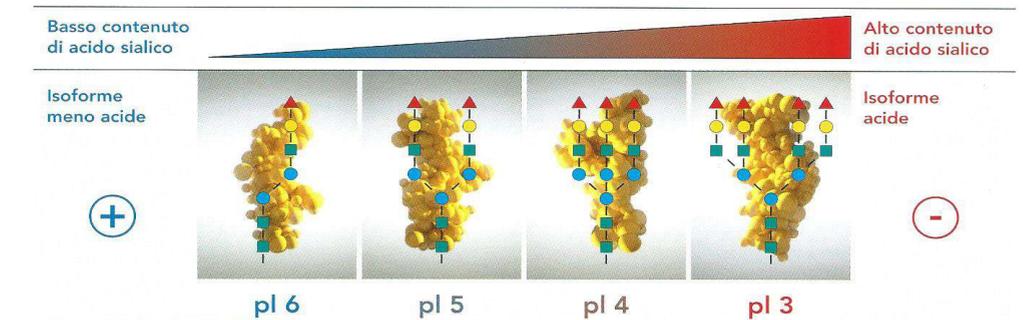
Farmaci utilizzati in PMA

Le **gonadotropine FSH, LH e hCG endogene**, ovvero prodotte fisiologicamente dall'ipofisi, **sono ormoni di natura glicoproteica composti da 2 subunità proteiche: α e β** . La subunità α contiene 92 aminoacidi ed è uguale in tutte le gonadotropine, anche nel TSH. La subunità β , più grande, contiene 111 aminoacidi, è differente nelle diverse molecole e conferisce specificità recettoriale e caratteristiche biologiche differenti alle diverse gonadotropine.

L'FSH è la gonadotropina che agisce nella prima fase del ciclo ovarico nello sviluppo del follicolo, dalla fase di follicolo antrale fino alla maturazione follicolare. **L'LH invece è la gonadotropina che interviene nella fase pre-ovulatoria**, che darà l'avvio all'ultima maturazione dell'ovocita, quindi alla seconda divisione meiotica fino alla metafase II, che è il punto in cui l'ovocita viene ovulato. **L'hCG è l'ormone della gravidanza, prodotto dal trofoblasto.**

In natura esistono diverse isoforme dell'FSH (**figura 1**) che differiscono per la loro parte glucidica, ovvero per il grado e le caratteristiche di gli-

© **Figura 1.** Rappresentazione schematica delle isoforme di FSH in funzione del punto isoelettrico



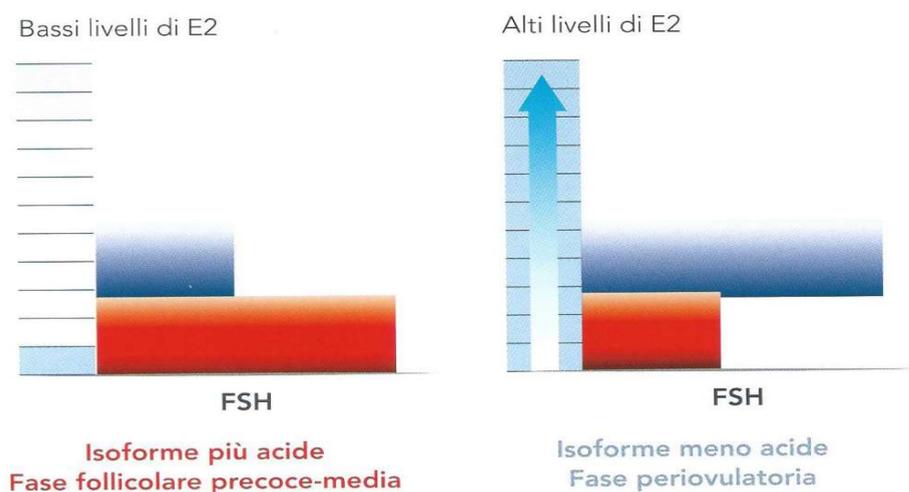
cosilazione a seconda del maggiore o minore contenuto di acido sialico: tutte le isoforme sono prodotte dall'adenoipofisi ma con differenze che ne caratterizzano la bioattività.

Nelle diverse fasi del ciclo ovarico, l'adenoipofisi secreta l'FSH in modo diverso e non casuale, privilegiando, nella **fase follicolare precoce, le isoforme più acide** e, nella **fase periovulatoria, le isoforme meno acide** (figura 2).

Per quanto riguarda le principali funzioni delle gonadotropine, l'**FSH svolge un ruolo nella proliferazione delle cellule della granulosa, stimola la produzione e quindi l'espressione dei recettori dell'LH** che servono a preparare l'ovulazione, **partecipa alla sintesi degli estrogeni** perché blocca, con un meccanismo di feedback negativo, la secrezione di FSH e **ha un'emivita di 3-4 ore**.

L'**LH** invece è l'ormone della fase tardiva che **determina l'ultima fase di maturazione dell'ovocita**, quella che lo porterà all'ovulazione. In questa fase follicolare tardiva l'LH viene prodotto in grandi quantità ma ha un'emivita molto breve, di circa 20 minuti. In realtà, anche se l'LH ha una funzione specifica nella fase follicolare tardiva, è stato dimostrato che **interviene anche nella fase follicolare precoce** seppure in quantità notevolmente ridot-

© **Figura 2.** Rappresentazione schematica dei livelli estrogenici durante il ciclo mestruale e pattern di rilascio naturale delle isoforme di FSH

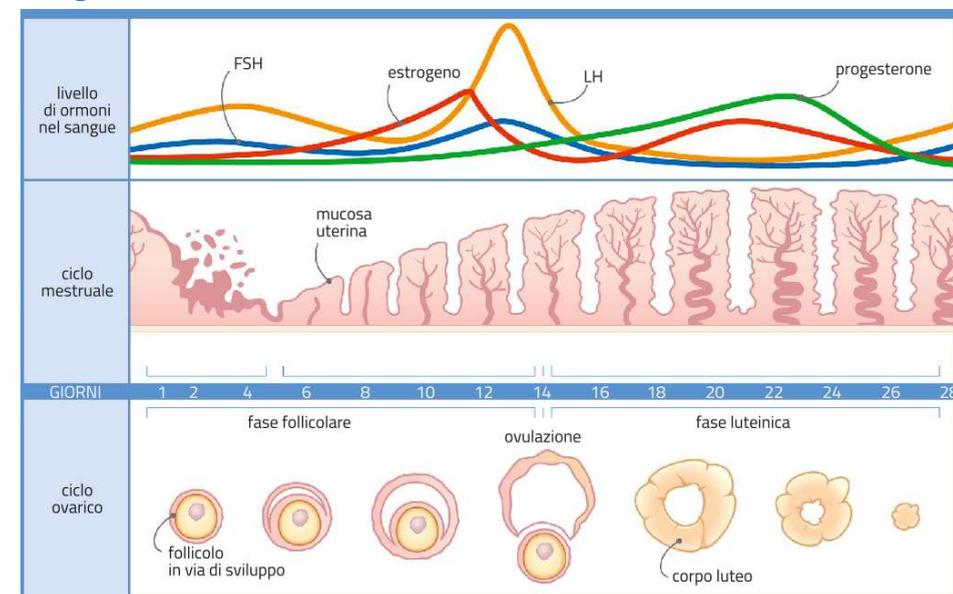


te, **incidendo nella maturazione dei follicoli**. Infine, l'**hCG è la molecola della gravidanza secreta dalle cellule del trofoblasto dell'embrione**. Tale ormone non interviene nel ciclo ovarico, ma **la sua similitudine con l'LH lo rende utile ai fini della fecondazione assistita anche in virtù della differenza di emivita importante rispetto all'LH: l'hCG ha infatti un'emivita di 24 ore** (contro i 20 minuti dell'LH) e questa caratteristica gioca un ruolo importante nella stimolazione ovarica delle tecniche di PMA.

Ogni donna, nella fase follicolare del suo ciclo, presenta un numero differente di follicoli antrali. Nella fecondazione naturale viene selezionato un solo follicolo, quello con maggiore sensibilità all'FSH, mentre tutti gli altri vanno incontro ad apoptosi spontanea. **Nella fecondazione assistita serve un numero maggiore di ovociti rispetto all'ovulazione della donna: lo scopo è infatti quello di determinare uno sviluppo follicolare multiplo, aumentando le dosi di FSH laddove l'ovaio metta a disposizione un numero limitato di follicoli ed evitando l'apoptosi dei follicoli che non sarebbero andati a maturazione**.

Come mostra la **figura 3**, l'FSH aumenta la sua produzione nella fase follicolare precoce, mentre l'LH, pur essendo presente significativamente nella fase follicolare, presenta un picco importante nella fase ovulatoria.

© **Figura 3.** Ciclo ovarico

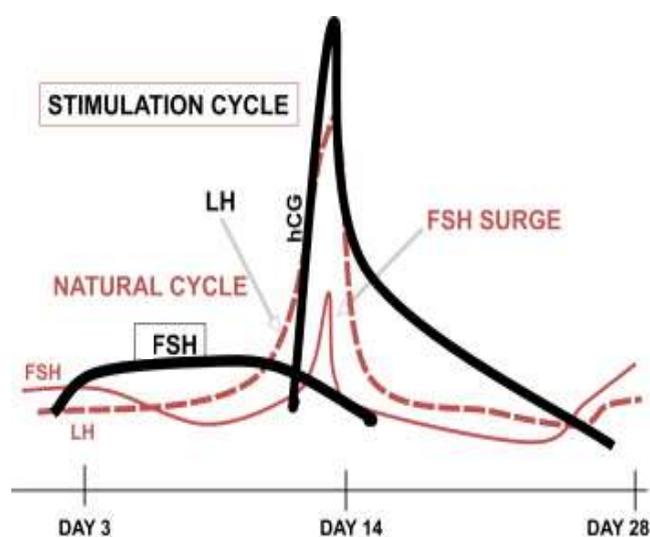


Questi percorsi sono in parallelo con la produzione di estrogeni e progesterone operati dal follicolo. FSH e LH intervengono sul follicolo in via di sviluppo, determinando lo sviluppo del follicolo e l'ovulazione. Successivamente, il corpo luteo produce progesterone, fondamentale per la preparazione endometriale. L'estrogeno prodotto in una prima fase determina la crescita e lo sviluppo dell'endometrio, fino a raggiungere i massimi livelli nella fase ovulatoria; successivamente il progesterone determina una trasformazione secretiva adatta per l'impianto dell'embrione.

Con le tecniche di PMA si cerca di riprodurre i processi fisiologici fin qui descritti ma ovviamente i livelli ematici di FSH ottenuti con i dosaggi di gonadotropine raggiungono concentrazioni maggiori rispetto a quelli che si hanno in natura. Anche il picco pre-ovulatorio che si va a determinare prima dell'ovulazione per indurre l'ultima maturazione a livello dell'ovocita è maggiore rispetto a quello prodotto in natura dalle gonadotropine endogene (figura 4).

Le **gonadotropine** sono farmaci impiegati **in tecnica farmaceutica** da oltre ottant'anni. Nel tempo, hanno subito un'importante evoluzione: le prime gonadotropine furono estratte negli anni Trenta dalle urine dei cavalli;

© **Figura 4.** Picco pre-ovulatorio nella PMA e nel ciclo naturale



agli anni Settanta risale la prima gonadotropina di estrazione urinaria, la menotropina; a partire dagli anni Ottanta si hanno le prime caratterizzazioni di gonadotropine, in particolare la differenziazione dell'FSH e dell'hCG, con processi che riuscivano a separare i due ormoni; negli anni Novanta migliorano ulteriormente i processi di produzione e grazie all'ultrapurificazione si ottiene un FSH con una purezza quasi assoluta; parallelamente si iniziano a produrre le prime gonadotropine ricombinanti di FSH, LH e hCG; è del 2012 la corifollitropina, la prima gonadotropina FSH con un'azione simile a quella endogena ma con un'emivita decisamente diversa; nel 2017 viene prodotto l'ormone HMG con hCG di origine placentare e un FSH ricombinante espresso da linee cellulari umane.

La **menotropina è la prima vera gonadotropina utilizzata in PMA. Viene estratta dalle urine di donne in post-menopausa** con una serie di processi che con il tempo sono andati via via migliorando: fasi di estrazione, frazionamento, concentrazione, filtrazione e purificazione per riuscire a ottenere un prodotto più puro possibile con una componente proteica interferente sempre più bassa, fino ad arrivare a una **combinazione di FSH e LH con rapporto 1:1**.

La menotropina viene utilizzata nei protocolli di fecondazione assistita per la crescita follicolare multipla. I dosaggi sono personalizzati in base alla storia clinica, alla tipologia di ovaio e alla riserva ovarica della donna. La somministrazione avviene per via sottocutanea.

Una menotropina umana menopausale largamente utilizzata in PMA è la Meropur di Ferring. **Fostimon è una gonadotropina IBSA utilizzata per la crescita e la maturazione del follicolo quando è opportuno utilizzare solo la componente FSH senza LH**. Il dosaggio è personalizzato e la somministrazione può avvenire per via intramuscolare o sottocutanea.

Nell'induzione della maturazione follicolare, la gonadotropina corionica hCG è stata utilizzata al posto dell'LH per la sua similitudine con tale ormone. Entrambe le molecole si legano allo stesso recettore. Tuttavia, l'LH – necessaria nelle stimolazioni ovariche per indurre l'ultima fase della maturazione ovocitaria – è una molecola con un'emivita troppo breve, pertanto in PMA si sfrutta la similitudine dell'hCG.

L'estrazione della gonadotropina corionica avviene dalle urine delle donne in gravidanza. L'hCG ha la stessa azione dell'LH ma con emivita molto più lunga. In commercio esistono vari dosaggi, dalle 250 UI alle 10.000 UI, ma nelle stimolazioni ormonali per indurre la maturazione follicolare vengono impiegati prevalentemente i dosaggi più alti di 5.000-10.000 UI. La somministrazione avviene anche in questo caso per via sottocutanea o intramuscolare. I farmaci più utilizzati sono **Gonasi HP di IBSA** e Pregnyl di MSD.

Negli anni Novanta, con la tecnologia del DNA ricombinante, si sono ottenuti prodotti puri (prima FSH e poi LH e hCG) utilizzando linee cellulari CHO (Chinese Hamster Ovary, cellule ovariche di criceto cinese). In particolare, per l'FSH esistono due prodotti, la **follitropina α e β** , che differiscono per i metodi di purificazione. L'azione di questi ormoni ricombinanti è sempre quella di indurre la crescita follicolare e la maturazione ovocitaria. Anche in questo caso, i dosaggi vengono personalizzati e la somministrazione è sottocutanea.

In tali prodotti, il vantaggio è certamente la purezza, ma lo svantaggio è che l'FSH prodotto è di un solo tipo e non mantiene la variabilità delle isoforme presenti in natura. I prodotti rFSH commerciali sono Gonal F (α FSH) prodotto da Merck Serono e PUREGON (β FSH) prodotto da MSD e tra i biosimilari BEMFOLA (α FSH) di Gedeon-Richter e OVALEAP (α FSH) di Teva. L'LH ricombinante commercializzato è invece Luveris (rLH) di Merck Serono. Dal 2001 è disponibile anche la gonadotropina corionica ricombinante con hCG puro al 100% al dosaggio unico di 250 mg (6.500 UI). Il suo nome commerciale è Ovitrelle, anche questo prodotto da Merck Serono, e viene utilizzato in alternativa alla forma urinaria per l'induzione della maturazione finale dell'ovocita, con una somministrazione esclusivamente sottocutanea.

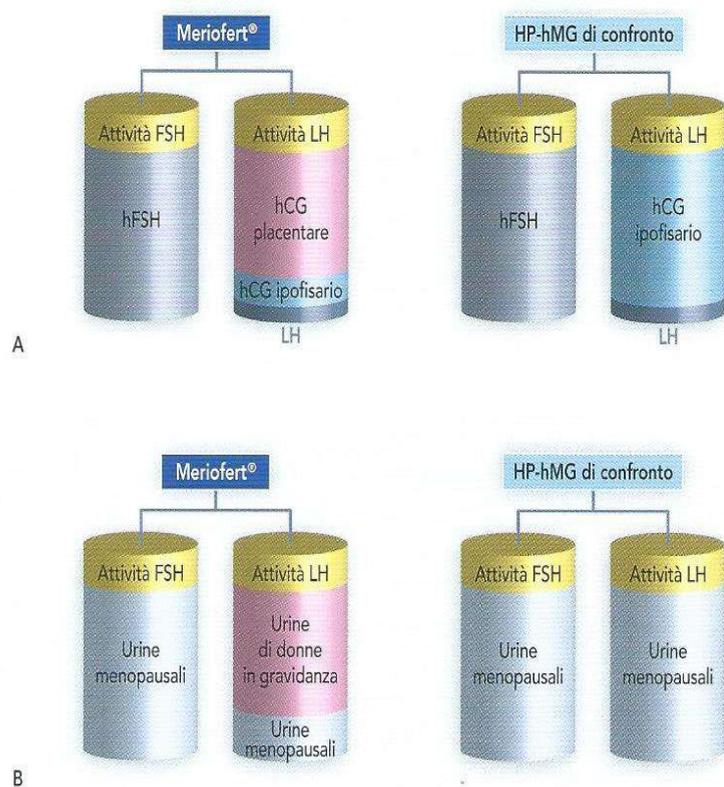
Nel 2007 per la prima volta vengono ricombinati FSH e LH in rapporto 150:75 UI (FSH:LH) in un unico prodotto, il Pergoveris di Merck Serono. La sua azione è sempre l'induzione della crescita follicolare e della maturazione ovocitaria, ma in maniera specifica in caso di ipogonadismo ipogonadotropo. La dose è personalizzabile e la somministrazione avviene per via sottocutanea.

Nel 2012 viene prodotta una gonadotropina diversa da quella endogena: la **corifollitropina α** , che vede l'aggiunta del peptide carbossi-terminale della subunità β hCG alla catena β di FSH. Il razionale della produzione di questa nuova molecola di FSH è rappresentato dalla sua emivita e dalla durata d'azione: raggiunge infatti il picco di massima concentrazione plasmatica al secondo giorno dalla somministrazione e ha una durata di azione di 7 giorni. Si propone pertanto una monosomministrazione il primo giorno del ciclo, alla quale può essere aggiunta, dopo sette giorni, una gonadotropina ad azione giornaliera. Il profilo farmacodinamico è simile a quello dell'FSH, ma sono dimostrate una maggiore durata d'azione e una maggiore bioattività. Il dosaggio deve essere personalizzato in base all'età e al peso corporeo della paziente e scelto tra i due dosaggi disponibili di 100 e 150 mg. Il nome commerciale è Elonva prodotto da MSD. Tra le novità più recenti, **nel 2017 è stata prodotta la prima menotropina con azione LH estratta da hCG placentare che prevede l'estrazione dell'FSH dall'urina di donne in menopausa e dell'hCG dall'urina di donne in gravidanza, entrambi altamente purificati.** Il rapporto FSH e hCG è 75:75 UI. Il dosaggio è personalizzabile e la somministrazione sottocutanea.

La **figura 5** mostra un confronto tra due diverse menotropine in commercio. A destra è rappresentata schematicamente la formulazione di Meriofert, a sinistra l'altro HP-hMG disponibile.

Dal 2017 è disponibile in commercio anche la **follitropina δ ricombinante** che differisce dalle precedenti perché **è espressa da linee cellulari umane, in particolare dalle cellule retiniche.** Ha una diversa modalità di utilizzo, infatti a differenza delle precedenti **si dosa in microgrammi, e il dosaggio viene stabilito in modo personalizzato non più dal medico ma da un software che elabora i dati sul peso corporeo e sull'AMH (od ormone antimulleriano) della paziente.** L'AMH è un marcatore della riserva ovarica, in assoluto il più utilizzato nelle tecniche di fecondazione assistita insieme alla conta dei follicoli antrali e all'età. Nel caso della follitropina δ ricombinante, dunque, non viene presa in considerazione l'età della paziente, e questo rappresenta un limite del farmaco. Inoltre, un altro limite alla possibilità di impiego è che

© **Figura 5.** Confronto tra hMG



l'AMH deve essere dosato necessariamente nei 12 mesi precedenti ed esclusivamente con una tecnologia ELECSYS AMH plus immunoassay di proprietà Roche.

La **Nota AIFA 74** prevede la prescrivibilità delle gonadotropine a carico del SSN per l'infertilità maschile e femminile e per la preservazione della fertilità femminile, ma con alcune limitazioni: per la donna, età <45 anni e FSH endogeno <30 UI/nl; per l'uomo, FSH endogeno <8 UI/nl.

Per concludere la carrellata sui farmaci impiegati in PMA non si può non citare anche il **clomifene citrato**, un farmaco abbastanza datato, appartenente alla classe dei SERM, ancora largamente utilizzato in quanto a differenza delle gonadotropine è un selezionatore del recettore degli estrogeni. **Ha quindi un'azione di inibizione sull'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio con conseguente rilascio endogeno di gonadotropine**

che agiscono sull'ovaio. Il farmaco è prevalentemente impiegato nella cura dell'ovaio policistico per i protocolli di induzione dell'ovulazione multipla ma anche nella PMA viene spesso utilizzato in quelle pazienti che non rispondono agli altri farmaci perché contribuisce a stimolare il più possibile l'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio. Il problema del clomifene citrato è che sull'endometrio è meno stimolante, proprio perché agisce bloccando i recettori degli estrogeni. In questi casi si combina con l'azione dell'estradiolo assunto per via orale. I farmaci in commercio più utilizzati a base di clomifene citrato sono Clomid di Bruno Farmaceutici e Serofene di Merck Serono.

I farmaci fin qui passati in rassegna, le gonadotropine, servono a indurre l'ovulazione multipla e la maturazione finale dell'ovocita, ma un grosso problema nelle tecniche di PMA è stato rappresentato anche dall'inibizione del picco endogeno di LH, che procurando un'ovulazione spontanea esclude la possibilità di recuperare ovociti. Oggi, il problema è completamente superato grazie ai cosiddetti **analoghi del GnRH**, farmaci stimolanti che hanno la funzione di bloccare il picco endogeno di LH, spesso precoce in pazienti in cura con PMA proprio a causa dello sviluppo follicolare multiplo.

Esistono due classi di GnRH: gli agonisti del GnRH e gli antagonisti del GnRH. **Il GnRH è un ormone secreto in modo pulsatile dall'ipotalamo che agisce sull'adenoipofisi, legandosi a un recettore specifico e stimolando la secrezione di FSH ed LH.** Entrambe le classi di farmaci, sia gli agonisti che gli antagonisti, si legano allo stesso recettore del GnRH ma con un'azione differente.

La prima classe di farmaci a essere introdotta negli anni Ottanta è quella degli **agonisti del GnRH**, che **agiscono sull'ipofisi in due tempi: inizialmente vi è una massiva azione di rilascio di gonadotropine dovuta al sovrastimolo del recettore (effetto "flare-up"), successivamente questa azione viene sovvertita e si ha un'inibizione della sintesi delle gonadotropine.** In questa fase, **la soppressione dei recettori fa sì che il GnRH endogeno non stimoli più l'adenoipofisi, bloccando la produzione ipofisaria endogena di FSH ed LH.** Questi farmaci vengono somministrati o per via sottocutanea o per via nasale,

ma quest'ultima è oggi molto poco utilizzata in quanto ha un assorbimento ridotto e meno controllato nel tempo.

I protocolli di impiego dei farmaci agonisti del GnRH sono di due tipi: il più datato, detto **protocollo lungo**, prevede la somministrazione di una dose unica o giornaliera di GnRH a partire dalla fase luteale del ciclo che precede la stimolazione. Quindi, su un ciclo regolare di 28 giorni, **la somministrazione avviene a partire dal 21esimo giorno del ciclo che precederà la stimolazione ormonale**. Il rationale di questo protocollo è quello di determinare un blocco dell'azione dell'ipofisi, in modo da essere certi di non avere stimolazione spontanea.

A questo protocollo tradizionale si è aggiunto più recentemente un altro protocollo che sfrutta invece l'effetto flare-up dell'agonista. Nel **protocollo corto (o ultracorto) la somministrazione dell'agonista GnRH avviene nella fase follicolare precoce, quindi quasi contemporaneamente alle gonadotropine**. In questo modo si cerca di sfruttare l'effetto flare-up dell'agonista, che determina inizialmente una massiva immissione in circolo di gonadotropine endogene, le quali si vanno a sommare alle gonadotropine somministrate come farmaco per potenziare al massimo la stimolazione ormonale. Questo protocollo è particolarmente adatto alle pazienti *poor responder*, per avere una stimolazione più efficace possibile.

Una terza possibile azione degli agonisti del GnRH è quella **trigger**, utilizzata quando si vuole indurre l'ovulazione nel modo più rapido possibile e con la minore azione prolungata nel tempo al fine di ridurre le sindromi da iperstimolazione. In questi casi, **l'agonista del GnRH viene somministrato in monodose**, al posto dell'hCG, cioè **nella fase follicolare tardiva in cui l'ovocita deve solo maturare**. Proprio per il suo effetto flare-up, l'agonista del GnRH determina un'immissione in circolo di gonadotropine, tra cui l'LH che raggiunge un picco spontaneo sufficiente a indurre la maturazione finale dell'ovocita. Questa modalità d'impiego del farmaco è utile solo nelle pazienti che hanno un reale rischio di iperstimolazione, perché il picco spontaneo di LH che si viene a creare è molto breve. L'emivita così breve del picco endogeno è sufficiente per determinare la maturazione dell'ovocita, ma non per sostenere – soprattutto a li-

vello endometriale – la trasformazione dell'endometrio nella fase post-ovulatoria: in questi casi, infatti, di solito non è possibile il trasferimento nell'embrione sia per il rischio di iperstimolare la paziente sia perché non c'è una preparazione endometriale adeguata.

Possibili effetti collaterali degli agonisti del GnRH sono in genere prurito nel punto di iniezione e, nelle terapie di lunga durata, effetti da ipoestrogenismo come vampate di calore, insonnia, cefalea, secchezza della mucosa vaginale ecc., tuttavia rari nei protocolli di PMA.

Questi farmaci non sono coperti dalla Nota 51, che prevede il rimborso solo per patologie oncologiche o per endometriosi, ma non per fecondazione assistita. **Restano dunque a carico della paziente**. I farmaci agonisti del GnRH in commercio sono: Suprefact di Aventis Pharma, Decapeptyl di Ipsen, Gonapeptyl di Ferring ed Enantone di Takeda.

Alla fine degli anni Novanta è stata introdotta la seconda classe di farmaci, ovvero gli **antagonisti del GnRH**, che hanno un'azione sull'ipofisi diversa rispetto agli agonisti. Infatti, **hanno un legame competitivo sul recettore per il GnRH nativo con un'azione immediata già dalla prima somministrazione di inibizione delle gonadotropine endogene**. Tali farmaci si somministrano per via sottocutanea secondo due protocolli: lo **schema fisso** prevede l'inizio della somministrazione al quinto-sesto giorno del ciclo di stimolazione, indipendentemente dallo sviluppo follicolare, lo **schema flessibile** invece prevede la somministrazione in base al diametro follicolare, ovvero quando il follicolo raggiunge i 13-14 mm di diametro e c'è quindi il rischio di ovulazione spontanea per LH endogeno. Il blocco sul recettore è immediato, pertanto il recettore bloccato impedisce subito la secrezione endogena di gonadotropine.

Gli antagonisti del GnRH sono ad oggi ampiamente usati nella PMA sia perché riducono la durata della stimolazione evitando le sindromi da iperstimolazione sia perché riducono la dose di gonadotropine necessaria. Gli effetti collaterali sono molto lievi, in genere da inoculazione quindi prurito, bruciore e arrossamento nella zona dell'iniezione, con durata breve e risoluzione spontanea nella maggior parte dei casi. **Anche questa è una classe di farmaci a carico della paziente e anche piuttosto costosa** (in

Italia, dai 50 ai 60 euro per singola fiala). I farmaci in commercio sono Cetrotide di Merck Serono, Orgalutran di MSD e Fyremadel di Ferring.

Il **progesterone** è il farmaco di scelta per il **supporto alla fase luteale**. Nei cicli di IVF è fortemente raccomandato e il farmaco di elezione è il progesterone naturale, somministrabile per diverse vie anche se quella orale non è raccomandata, in quanto l'assorbimento a livello uterino non è sufficiente. Quindi, sono da preferire la via intramuscolare, quella sottocutanea e la via vaginale sotto forma di progesterone micronizzato in capsule, gel e creme vaginali.

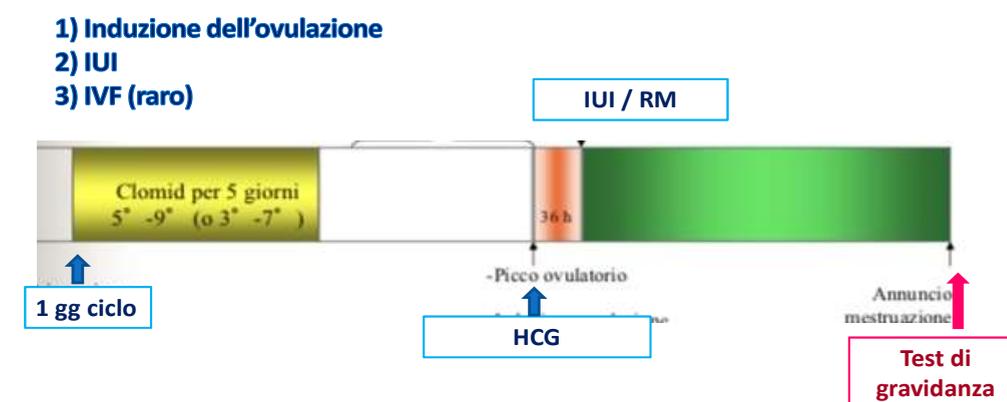
Classificandoli per via di somministrazione, sono disponibili in commercio **Prontogest** di Ibsa per via intramuscolare, **Pleyris** di Ibsa per via sottocutanea e Prometrium di Rottapharm, Progeffik di Effik e Crinone di Merck Serono per la via vaginale.

In caso di impossibilità di somministrazione del progesterone, il supporto della fase luteale può essere ottenuto con somministrazioni ripetute di hCG onde indurre una secrezione endogena di progesterone. In questi casi è raccomandata la dose di 2.000 UI ogni tre giorni, fino al test di gravidanza.

Protocolli di stimolazione

Il protocollo di stimolazione con Clomifene ha come principale funzione l'induzione dell'ovulazione, quindi può essere utilizzato anche nella donna che non ovula, nell'inseminazione intrauterina (IUI) e, più raramente, nella fecondazione *in vitro* (IVF), in genere associato alle gonadotropine sulle *poor responder*, con le quali i protocolli tradizionali non funzionano (**figura 6**). **Il protocollo prevede una somministrazione per 5 giorni, originariamente a partire dal quinto giorno del ciclo, più recentemente già dal terzo giorno** perché sembra avere un'azione migliore anche nelle donne che hanno un ciclo più breve. Il dosaggio è di 50 mg/die (una capsula) e può arrivare fino a 150 mg/die (3 capsule al giorno). Dopo i primi 5 giorni, nel protocollo tradizionale non si interviene più ma si aspetta che le gonadotropine endogene funzionino nello sviluppo del follicolo. È possibile tuttavia intervenire quando il follicolo raggiunge dimensioni adeguate, aiutando l'ovulazione con la somministrazione di hCG, e tentare la strada dei rapporti mirati piuttosto che dell'inseminazione intrauterina. La finestra ideale per l'inseminazione sono le 36 ore successive al picco ovulatorio.

© **Figura 6.** Stimolazione con Clomifene



DOSE: 50 mg/ die fino a 150 mg/die

INDICAZIONI: in IVF indicazione da solo o con gonadotropine solo per poor responder (non indicato nelle normo-responder)

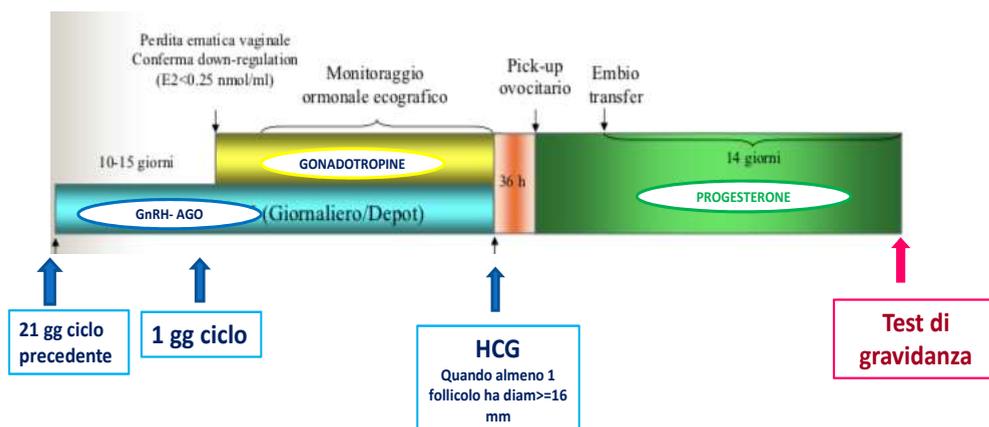
Esistono poi più protocolli di stimolazione con GnRH agonisti. Il protocollo più tradizionale è il **long protocol** (figura 7) così chiamato proprio perché **l'agonista del GnRH è utilizzato più a lungo a partire dalla fase medio-luteale del ciclo che precede la stimolazione ovarica**. Mediamente, quindi, su un ciclo regolare di 28 giorni, **la somministrazione va fatta intorno al 21esimo giorno per almeno 7 giorni prima della mestruazione**. Il long protocol sfrutta l'effetto flare-up dell'analogo del GnRH: nei primi giorni di stimolazione l'ipofisi è indotta ad aumentare la produzione endogena di gonadotropine che si sommano a quelle esogene somministrate. La durata della stimolazione è variabile da donna a donna e va seguita con un monitoraggio ormonale ed ecografico. Il monitoraggio ormonale prevede il dosaggio dell'estradiolo e del progesterone e viene eseguito insieme al controllo ecografico a partire dal sesto giorno del ciclo e successivamente ogni 48-72 ore, fino al raggiungimento di un follicolo con un diametro intorno ai 16 mm. **La somministrazione del GnRH agonista può avvenire in forma depot il primo giorno del ciclo con un'unica dose di 3,75 mg oppure in forma daily, somministrando quotidianamente per via sottocutanea 0,1-0,2 mg a partire dal 21esimo giorno del ciclo fino all'induzione dell'ovulazione**. Quando almeno un follicolo raggiunge un diametro pari o maggiore a 16 mm si somministra hCG con un dosaggio di 5.000-10.000 e a 34-36 ore si prelevano gli

ovociti. Questa tempistica è fondamentale per arrivare alla maturazione dell'ovocita, ma non all'ovulazione spontanea. Segue poi una fase di supporto alla fase luteale fino al test di gravidanza 14 giorni dopo il pick-up ovocitario.

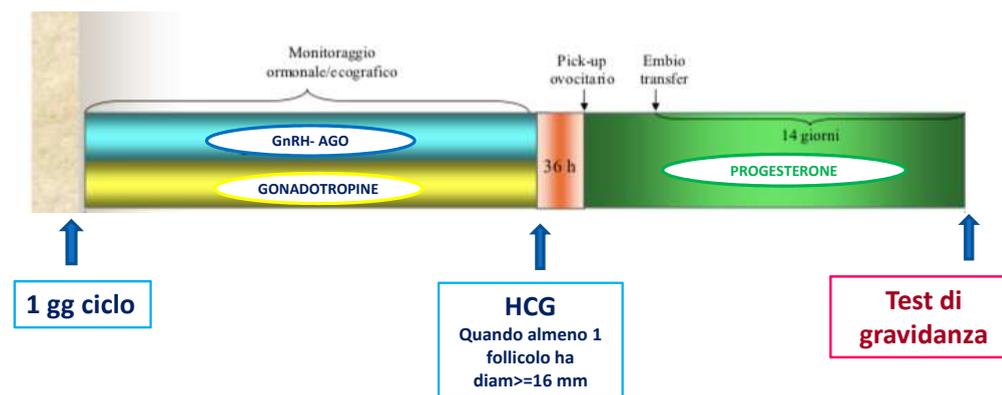
Il vantaggio di questo protocollo, usato quasi sempre per la fecondazione *in vitro* e raramente per l'induzione dell'ovulazione o l'inseminazione intrauterina, è l'ottima inibizione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio. Tuttavia, è un protocollo molto lungo, dalla durata di 20-30 giorni. Le gonadotropine utilizzate con questo protocollo sono le hMG, l'FSH ultrapurificato, l'rFSH e l'rLH. Non sono invece indicate ad oggi la corifollitropina α né la l'FSH δ . Questo protocollo è indicato nelle pazienti con endometriosi, dove si sfrutta l'agonista del GnRH anche per qualche mese precedente alla stimolazione. La dose raccomandata è di 37,5-300 UI.

Un altro protocollo di stimolazione con GnRH agonisti è il **protocollo corto**, o **short protocol** o **flare-up** (figura 8), molto usato in passato, che ha come razionale il fatto che utilizzando fin dalla fase follicolare precoce sia l'analogo del GnRH che le gonadotropine si riesce a sfruttare, soprattutto nelle pazienti considerate a bassa prognosi, l'effetto flare-up dell'agonista che comporta un'immissione transitoria di gonadotropine endogene, a cui vengono aggiunte le gonadotropine somministrate farmacologicamente. Anche questo protocollo prevede la somministrazione

© **Figura 7.** Stimolazione con GnRH agonisti: long protocol



© **Figura 8.** Stimolazione con GnRH agonisti: short protocol



di hCG quando almeno un follicolo raggiunge un diametro pari o maggiore a 16 mm.

Lo short protocol è utilizzato per le fecondazioni *in vitro* e raramente nell'inseminazione intrauterina. La sua durata è più limitata (circa 10-15 giorni) perché non considera la finestra della fase luteale. Gli agonisti possono essere somministrati in forma depot o in forma giornaliera. Per quanto riguarda le gonadotropine utilizzate con questo protocollo, come per il long protocol, sono le hMG, l'FSH ultrapurificato, l'rFSH e l'rLH. Non sono invece indicate ad oggi la corifollitropina α né la l'FSH δ . Anche le dosi sono le stesse, da 37,5 UI a non più di 300 UI. Il protocollo è controindicato nelle pazienti *iper-responder*, mentre l'indicazione assoluta è per le *poor responder* per le quali può rappresentare un tentativo estremo di ottenere il massimo dalle ovaie.

Ad oggi, tuttavia, **il protocollo di scelta è con il GnRH antagonista (figura 9)** che prevede la minore somministrazione di farmaco. **La stimolazione iniziale avviene solo con le gonadotropine, mentre la stimolazione con l'antagonista avviene quando almeno un follicolo ha raggiunto un diametro di 14 mm.**

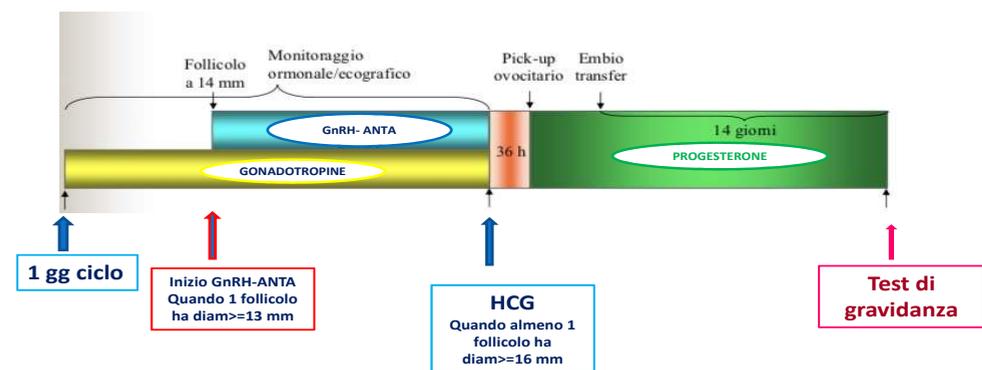
La differenza rispetto agli altri protocolli consiste quindi nella fase iniziale in cui si somministrano solo le gonadotropine (da indicazione, tutte quelle esistenti in commercio), mentre la somministrazione degli antagonisti inizia solo a metà stimolazione. Le dosi di gonadotropine sono comprese in un intervallo tra 37,5 e 300 UI, e non sono raccomandate dosi

superiori neanche nelle pazienti non-responder. La durata complessiva del trattamento è di circa 10-15 giorni.

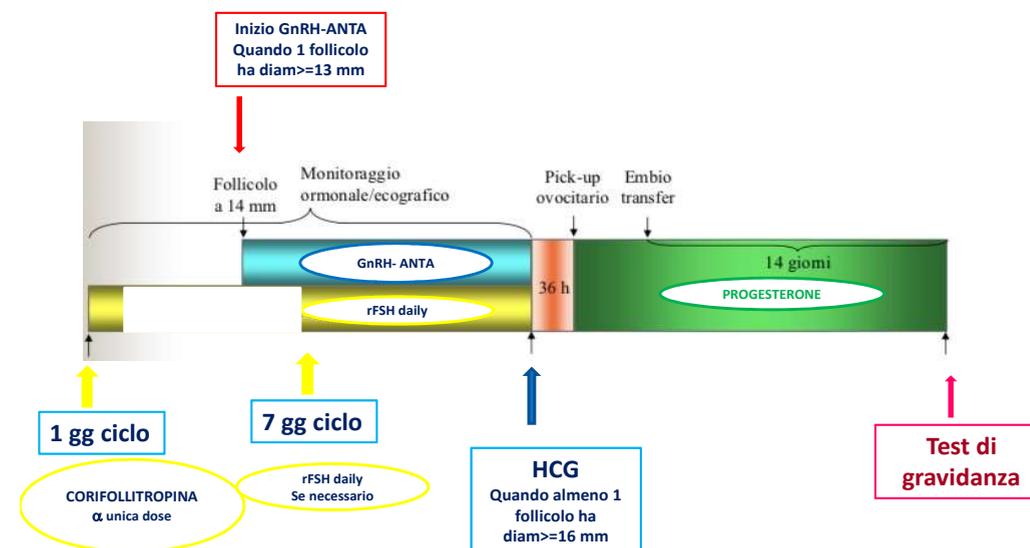
Tale protocollo si usa solo nella fecondazione *in vitro* e rappresenta il protocollo di scelta nelle pazienti normo-responder per le quali costituisce una raccomandazione forte, di tipo A, per la sicurezza ed efficacia, la breve durata e la minore dose di gonadotropine. Anche nelle pazienti iper-responder rappresenta il protocollo di scelta con una raccomandazione di tipo A, per la possibilità di indurre la maturazione finale ovocitaria con GnRH ed evitare la sindrome di iperstimolazione ovarica. Infine, nelle pazienti poor-responder si ha la stessa efficacia rispetto ai protocolli con GnRH agonista.

Il **protocollo con corifollitropina α prevede una monodose che sostituisce sette monodosi di gonadotropina daily (figura 10)**. La somministrazione inizia il primo giorno del ciclo, in base al peso e all'età della paziente. In quinta o sesta giornata va effettuato un controllo per stabilire se è il momento di iniziare l'antagonista. Al settimo giorno del ciclo è previsto un altro controllo per verificare se la maturazione follicolare è terminata oppure è necessario aggiungere una gonadotropina ricombinante. Il

© Figura 9. Protocollo con GnRH antagonista



© Figura 10. Protocollo con corifollitropina α



protocollo è indicato nella IVF e prevede una durata di 10-15 giorni, seppure con il vantaggio di un minor numero di iniezioni di farmaci. La somministrazione dell'antagonista può essere depot o giornaliera, mentre la **corifollitropina α** va somministrata in un'unica dose il primo giorno del ciclo. La sua durata d'azione è di sette giorni pertanto, trascorso questo periodo, se i follicoli non sono ancora pronti si può aggiungere dall'ottavo giorno rFSH a somministrazione giornaliera fino al raggiungimento della maturità follicolare.

Il protocollo presenta controindicazioni nelle pazienti iper-responder a rischio di sindrome da iperstimolazione perché la monosomministrazione non permette di modificare la terapia per i primi sette giorni in caso di risposta eccessiva. Il vantaggio è invece rappresentato da un miglior comfort per la paziente che deve eseguire meno somministrazioni sottocutanee di farmaco.

Tecniche di fecondazione assistita

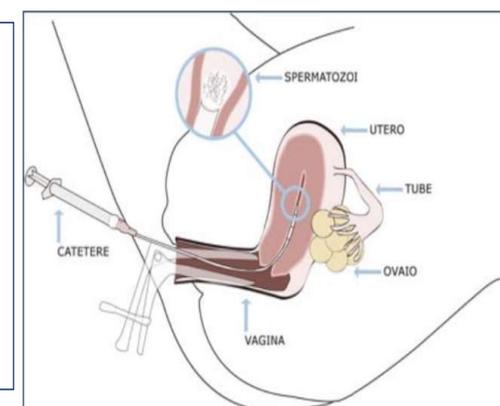
Le procedure di procreazione medicalmente assistita si dividono in **tecniche di I livello**, tra cui i rapporti mirati e l'inseminazione intrauterina (IUI); **tecniche di II livello**, ovvero FIVET (fecondazione *in vitro* con embryo-transfer) e ICSI (iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo), senza dubbio oggi la tecnica più utilizzata; **tecniche di III livello** per fattori maschili severi, quali prelievi testicolari degli spermatozoi, agoaspirato testicolare (TESA) e biopsia testicolare (TESE).

L'**inseminazione intrauterina (IUI)** è una tecnica che **prevede al momento dell'ovulazione l'introduzione nella cavità uterina, tramite un catetere collegato a una siringa, del liquido seminale del partner** opportunamente preparato (**figura 11**). È una metodica semplice, non invasiva che si esegue ambulatorialmente senza necessità di sedazione. Le due indicazioni principali per questa tecnica sono una **oligoastenospermia lieve/moderata** o un'**impotenza coeundi**, ovvero l'impossibilità di portare a termine un rapporto sessuale completo. In altri casi, come per l'endometriosi di I-II stadio, per il fattore cervicale o nei casi di sterilità idiopatica, l'inseminazione intrauterina ha perso di importanza ed è stata sostituita da tecniche più idonee. Il suo limite è che non interviene in nessun modo sulla donna ma l'unico rationale è quello di avvicinare gli

© **Figura 11.** Inseminazione intrauterina (IUI)

INDICAZIONI:

- ✓ Oligoastenospermia lieve-moderata
- ✓ Impotenza coeundi
- ✓ Endometriosi I-II stadio
- ✓ Fattore cervicale (?? Ruolo controverso)
- ✓ Sterilità Idiopatica



spermatozoi migliori all'ovocita (o agli ovociti) nel momento in cui vengono ovulati, per favorire una fecondazione naturale all'interno della tuba. Pertanto, **l'inseminazione intrauterina ha come principale indicazione quella di ottimizzare un liquido seminale con lievi alterazioni** che in genere riguardano la motilità degli spermatozoi: attraverso tecniche di preparazione nemaspermica, infatti, **si selezionano gli spermatozoi migliori e si utilizzano per l'inseminazione solo quelli dotati di motilità e morfologia soddisfacenti**. Le principali tecniche di preparazione nemaspermica sono lo swim-up e i gradienti di densità.

Le percentuali di successo dell'inseminazione intrauterina sono piuttosto basse (circa 10-20%), soprattutto nei casi in cui la paziente è avanti con l'età. Un altro limite è legato al costo del trattamento, in quanto ad oggi è previsto il rimborso di soli 3 cicli di procreazione assistita anche se per raggiungere risultati soddisfacenti sono necessari da 3 a 6 cicli. L'inseminazione può avvenire su un ciclo spontaneo oppure con stimolazione ovarica dell'ovulazione con clomifene e gonadotropine a basse dosi. Se necessario, è possibile indurre l'ovulazione con hCG da somministrare 32-36 ore prima della IUI e supportare la fase luteale attraverso la somministrazione di progesterone.

La procedura si effettua con una siringa legata a un piccolo catetere flessibile con uno speculum che evidenzia la portio, senza guida ecografica, per l'immissione del liquido seminale nella cavità uterina. È una tecnica abbastanza semplice e l'unica difficoltà, anche se rara, può essere quella di una stenosi cervicale.

La **fecondazione *in vitro* con embrio-transfer (FIVET)** è una tecnica dove **l'incontro tra ovocita e spermatozoo avviene *in vitro***, al di fuori del corpo della donna. La principale indicazione per l'utilizzo di tale tecnica di secondo livello è senza dubbio il **fattore tubarico**, proprio per la capacità di superare le difficoltà meccaniche di incontro tra lo spermatozoo e l'ovocita. Altri fattori di indicazione sono un **fattore maschile moderato**, l'**endometriosi di I e II stadio**, laddove falliscono le tecniche di I livello, **e di III e IV stadio** e infine le **forme di sterilità idiopatica**, anche in questo caso qualora falliscano le tecniche di I livello.

Si tratta di una tecnica storica: nel 1978 in Inghilterra nasce la prima bambina da FIVET effettuata dal biologo Robert Edwards, insignito nel 2010 dal premio Nobel per la medicina per lo sviluppo della fecondazione *in vitro*.

Il razionale è quello di **posizionare gli ovociti prelevati per via transvaginale all'interno di una provetta insieme agli spermatozoi capacitati**, al fine di favorirne l'incontro e la fecondazione *in vitro*. La preparazione degli spermatozoi è la stessa che si fa per l'inseminazione intrauterina. Il prelievo degli ovociti è sempre preceduto da un'iperstimolazione ovarica controllata per indurre un'ovulazione multipla. È necessario dunque un monitoraggio ormonale ed ecografico per valutare il momento di maturazione ovocitaria: 36 ore dopo l'induzione dell'ovulazione, che s'induce quando il follicolo raggiunge un diametro intorno a 17 mm, si effettua per via transvaginale ecoguidato il prelievo ovocitario con un ago di 17 gauge, in sedazione profonda o anestesia loco-regionale (meno frequentemente). Successivamente, **si osserva la fecondazione e lo sviluppo embrionario per 48-120 ore, dopodiché avviene il trasferimento dell'embrione o degli embrioni selezionati in utero, per via transcervicale attraverso un sottile catetere flessibile ecoguidato (figura 12)**. Le percentuali di successo dipendono dal fattore di sterilità, ma soprattutto dall'età della

© **Figura 12.** Fecondazione *in vitro* con embrio-transfer (FIVET)



Percentuali di successo: dipendenti dal fattore di sterilità ma soprattutto dall'età della donna

Oggi tecnica meno utilizzata a favore della ICSI che dà maggiore percentuale di fecondazione

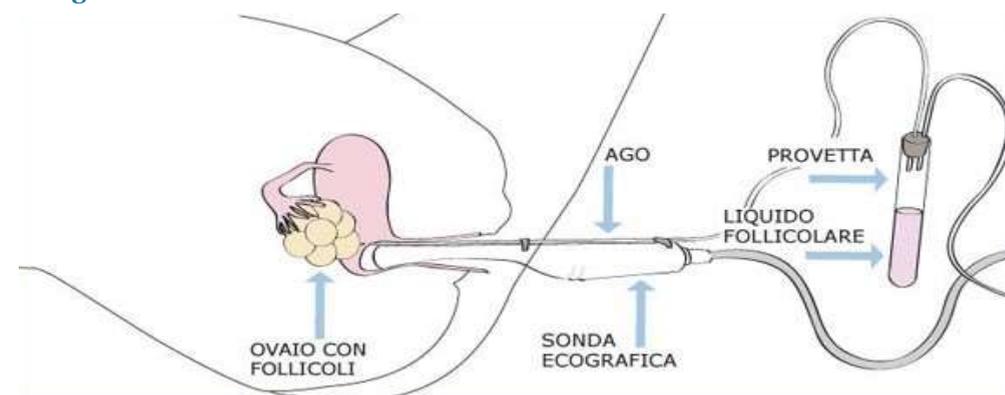
donna, con alte percentuali di successo nelle donne giovani con semplice fattore tubarico, fino a percentuali bassissime nelle over 40. Oggi la FIVET è una tecnica sempre meno utilizzata a favore della ICSI, che dà senza dubbio migliori risultati.

L'**iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI)** è una tecnica che **prevede un'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo all'interno dell'ovocita maturo**. Si utilizza principalmente per gravi fattori maschili, in caso di forme di **oligoastenozoospermia** o di **criptozoospermia** gravi, e in caso di **azoospermia ostruttiva o secretiva**. Sebbene nasca come tecnica di PMA per condizioni di grave infertilità maschile, quando gli spermatozoi disponibili sono molto pochi, oggi l'ICSI ha sostituito quasi completamente la FIVET per i suoi maggiori tassi di successo.

Gianpiero Palermo, un ginecologo italiano emigrato negli USA, è il pioniere della ICSI, che è stata eseguita per la prima volta nel 1992. Sembrerebbe che la sua scoperta sia dovuta in realtà a un errore: prima si utilizzava, infatti, una tecnica chiamata **SUZI** in cui l'iniezione dello spermatozoo avveniva nello spazio perivitellino, ovvero nello spazio al di fuori della membrana citoplasmatica. Da un potenziale errore, quindi, iniettando gli spermatozoi più in profondità rispetto allo spazio vitellino, è stata rivoluzionata la tecnica della fecondazione assistita.

Il **prelievo ovocitario (figura 13)** è una procedura che avviene in ambulatorio chirurgico, preferibilmente sotto sedazione. **Si utilizza la sonda ecografica transvaginale a cui viene montato un ago**. Dopo una disinfezione vaginale della paziente sedata con clorexidina o con soluzione fisiologica, e comunque mai con prodotti a base di iodio altamente lesivi per gli ovociti, si posiziona l'ago sulla porzione della sonda ecografica e si inizia a osservare l'ovaio. **La provetta è collegata con un tubo alla pompa di aspirazione dei follicoli e con un secondo tubo all'ago in modo da permettere il passaggio diretto dal follicolo alla provetta**. La provetta, dove può essere trasferito anche più di un ovocita, verrà mandata in laboratorio di analisi che deve essere collegato all'ambulatorio chirurgico attraverso una porta o una finestra comunicanti.

© **Figura 13.** Prelievo ovocitario

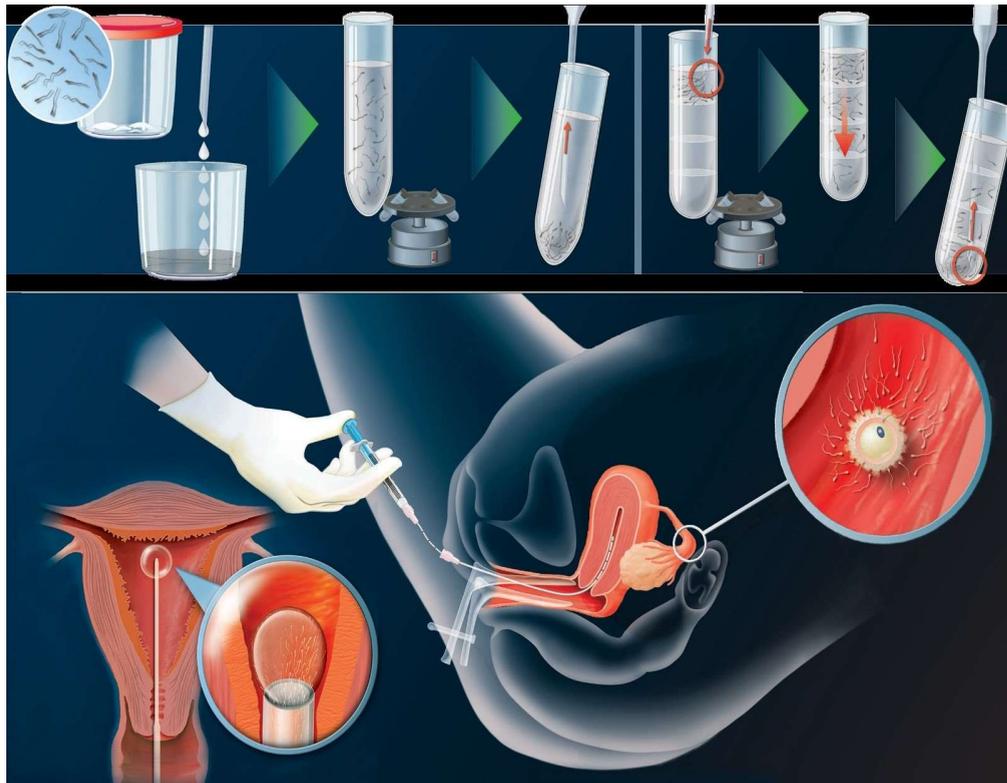


A questo punto, **il biologo effettua sotto cappa il conteggio degli ovociti nelle piastre di Petri e li posiziona in un incubatore**. A distanza di un'ora gli ovociti vengono decumulati, ovvero puliti, dalle cellule della **granulosa** per verificarne il grado di maturità: verranno selezionati gli ovociti maturi, ovvero quelli nella seconda metafase, che corrisponde al momento di ovulazione della donna. **Il micromanipolatore è lo strumento con cui il biologo esegue la ICSI, ovvero preleva lo spermatozoo e lo inietta nell'ovocita. Il materiale viene così depositato in un incubatore dove avverrà la fertilizzazione dell'embrione**. L'osservazione avviene 24 ore dopo la ICSI e il trasferimento dell'embrione può avvenire dalle 48 alle 120 ore di vita dell'embrione, raramente dopo i 5 giorni.

Il **trasferimento embrionario (embryo transfer)** è una procedura ambulatoriale, veloce e indolore, che non richiede alcun tipo di analgesia. **Uno o più embrioni vengono immersi in una goccia di terreno di coltura e inseriti sotto osservazione microscopica all'interno di un catetere molto sottile e morbido. La punta di questo catetere oltrepassa il collo dell'utero e raggiunge la cavità uterina dove vengono rilasciati uno o più embrioni (figura 14)**. È una manovra molto delicata in quanto è necessario evitare ogni stress agli embrioni e alla mucosa che riveste la cavità uterina (endometrio).

A 24 ore dalla ICSI, dunque, si osservano gli embrioni per verificare il livello di fecondazione: l'ovocita maturo si riconosce dalla presenza del I globulo

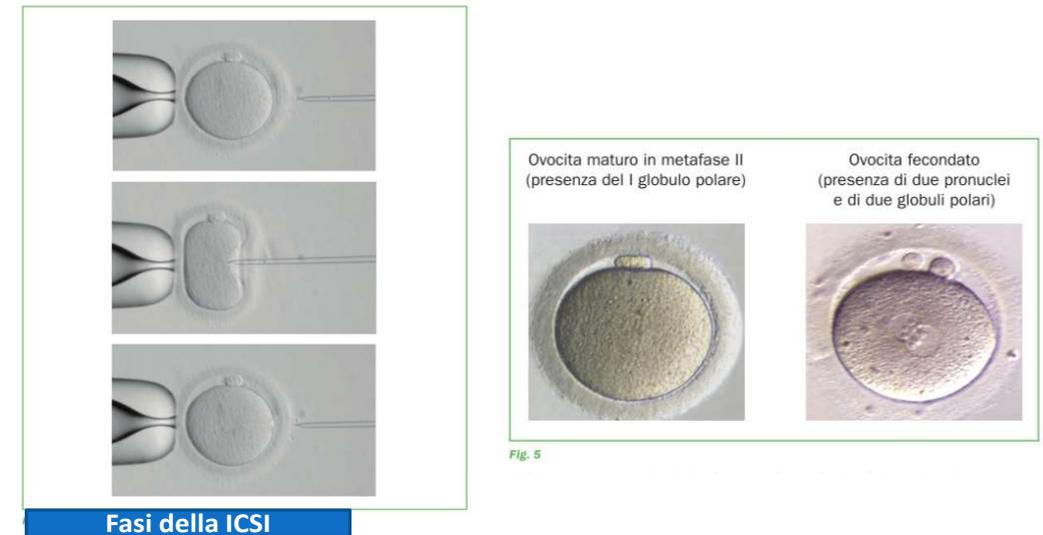
© **Figura 14.** Trasferimento embrionario (embryo transfer)



polare, quello che l'ovocita estrude alla prima divisione meiotica. L'ovocita fecondato mostra la presenza di due pronuclei e due globuli polari (**figura 15**). Lo stato di maturazione degli ovociti va sempre osservato anche per escludere eventuali anomalie e valutare la qualità dell'embrione.

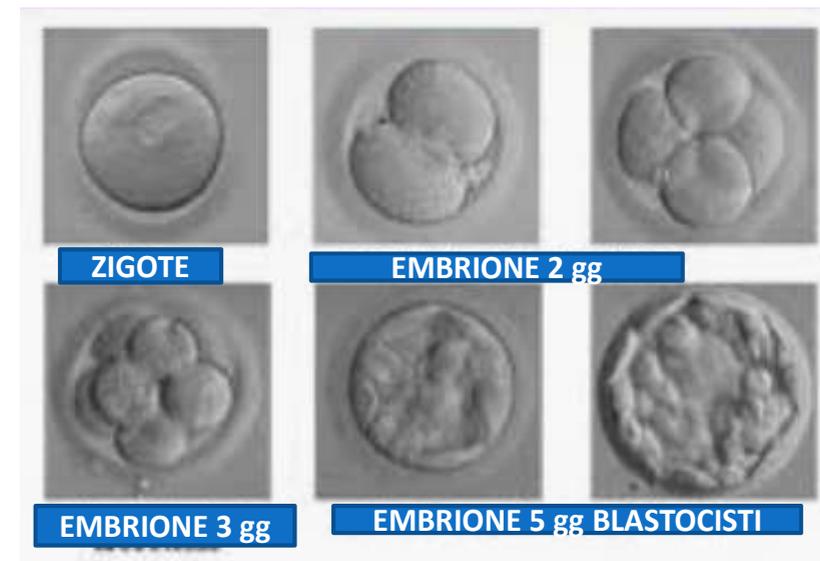
In **figura 16** sono rappresentate le fasi di sviluppo dell'embrione: dallo zigote si ha nell'arco di 24-48 ore il passaggio a embrione a 2 o 4 cellule; in terza giornata a 6-8 cellule; in quarta giornata l'embrione è un aggregato di cellule detto **morula**; al quinto giorno l'embrione è rappresentato dalla **blastocisti**, che al contrario degli altri embrioni comincia a presentare una cavitazione liquida, detta **blastocèle**: questo è il momento in cui naturalmente avviene l'impianto dell'embrione. Per il trasferimento embrionario, non bisogna attendere oltre cinque giorni per evitare il fenomeno dell'hatching (AH), ovvero la rottura della zona pellucida embrionaria.

© **Figura 15.** Fasi della ICSI e fecondazione dell'ovocita



Fasi della ICSI

© **Figura 16.** Fasi di sviluppo di embrioni umani pre-impianto



Tra le tecniche di procreazione di III livello, il **prelievo testicolare degli spermatozoi** è indicato nelle forme di **fattore maschile grave (criptozoospermia)**, ovvero presenza di un numero estremamente basso di spermatozoi eiaculati), nelle forme di **azoospermia ostruttiva** (caratterizzata da

una produzione normale degli spermatozoi ma da un'ostruzione al passaggio degli spermatozoi lungo le vie seminali) e in quelle di **azoospermia secretiva** (causata da un deficit di produzione degli spermatozoi da parte del testicolo).

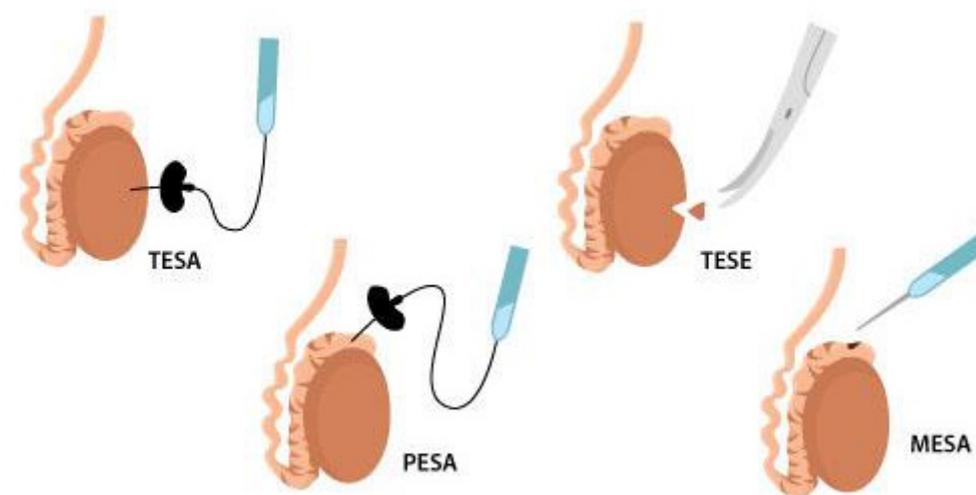
Le tecniche di prelievo testicolare sono di due tipi: l'**ago-aspirazione degli spermatozoi dal testicolo (TESA)** o il loro **prelievo biotico (TESE)**. Nella TESA si procede al prelievo attraverso la cute del testicolo, utilizzando un sottilissimo ago a farfalla a cui è collegata una siringa che provvede all'aspirazione intratesticolare del singolo tubulo seminifero. È una procedura ambulatoriale, semplice e non particolarmente dolorosa, anche se una lieve sedazione del paziente aiuta il medico a effettuare con più precisione il prelievo. Nella TESE invece gli spermatozoi vengono prelevati dai testicoli tramite una vera e propria incisione del testicolo, il che rende questa tecnica una procedura più invasiva. La biopsia è obbligatoria nelle forme di grave danno testicolare.

Oltre che a livello testicolare, che è la forma più frequente, **il prelievo può essere fatto anche a livello dell'epididimo**, un canale collegato al testicolo, nel tentativo di trovare uno spermatozoo più maturo. Anche in questo caso, le tecniche di prelievo dall'epididimo possono essere **l'ago-aspirazione (MESA) o la biopsia (PESA)** (figura 17).

Embrioni, ovociti, liquido seminale e tessuto testicolare possono essere sottoposti a **crioconservazione**. Esistono varie tecniche di crioconservazione. Nel **congelamento lento (slow-freezing)** si verifica una crioconservazione sufficientemente lenta da permettere un'adeguata disidratazione cellulare minimizzando la formazione di ghiaccio intracellulare. In questa tecnica si utilizzano concentrazioni relativamente basse di crioprotettori, sostanza che viene immessa all'interno dell'ovocita o dell'embrione per proteggerlo dai danni da congelamento dovuti alla formazione di ghiaccio.

La **vitrificazione**, che ha sostituito quasi completamente il congelamento lento, prevede alte concentrazioni di crioprotettori e un rapido processo di congelamento. È la tecnica più usata perché dà una migliore percentuale di sopravvivenza soprattutto per gli ovociti, quindi una mi-

© **Figura 17.** Tecniche di prelievo degli spermatozoi



gliore percentuale di fecondazione con conseguente maggiore tasso di gravidanze.

Infine, una tecnica di crioconservazione valida per gli spermatozoi è il **congelamento rapido di Sherman**.

Le tecniche di crioconservazione, ad oggi largamente usate, hanno permesso una notevole evoluzione della PMA. I principali vantaggi derivanti dalla crioconservazione consistono in primo luogo nella possibilità di **eseguire un singolo trasferimento embrionale riducendo le gravidanze gemelari ed eliminando quasi completamente le gravidanze trigemine**, che nei primi anni della Legge 40 – quando si era costretti a trasferire anche tre embrioni – erano sensibilmente aumentate. Oggi, quasi sempre si esegue il singolo embryo-transfer, soprattutto quando la donna ha meno di 38 anni. Un altro vantaggio della crioconservazione è senza dubbio la **riduzione delle sindromi da iperstimolazione**, che può essere considerata la complicanza più grave della stimolazione ovarica controllata. Inoltre, la crioconservazione permette la possibilità di effettuare sia una **diagnosi genetica preimpianto (PGD)** – indicata nel caso in cui uno o entrambi i futuri genitori siano portatori o affetti da un disordine genetico –, che consente

di esaminare il corredo genetico dell'embrione in maniera da permettere il transfer preferenziale degli embrioni geneticamente normali, sia uno **screening genetico preimpianto (PGS)** che analizza il corredo cromosomico dell'embrione nella sua interezza valutando alterazioni di numero o di struttura dei cromosomi, ed è quindi particolarmente indicato nei casi di età materna avanzata (>38 anni), abortività ricorrente e ripetuti fallimenti di impianto. Infine, la crioconservazione ha consentito **tecniche di preservazione della fertilità maschile e femminile**, sia per cause patologiche che per motivi sociali. Nel primo caso (**oncofertilità**) quando ci sono potenziali danni alle gonadi da terapie obbligatorie per la salute della donna, nel secondo caso (cosiddetto **social-freezing**) quando per scelta una donna decide di posticipare la sua maternità e mette da parte gli ovociti per utilizzarli in futuro. Il social-freezing è una procedura non prevista dal sistema sanitario e attualmente eseguibile solo in regime privato.

Oncofertilità

La preservazione della fertilità in pazienti oncologici è un percorso sempre più frequente e importante. **Viene effettuata prevalentemente nelle pazienti in età fertile con patologia tumorale che ancora non hanno manifestato il desiderio di una gravidanza per motivi personali o di età e che devono sottoporsi a terapie potenzialmente gonadotossiche** (principalmente chemioterapia e radioterapia pelvica). Negli ultimi anni, sono in aumento le terapie oncologiche che hanno sì maggiore effetto sulla malattia primaria ma risultano talvolta più aggressive anche su organi sani come appunto le gonadi. L'introduzione e il potenziamento delle tecniche di fecondazione assistita – oggi sempre più efficaci – hanno reso possibile la fertilità anche in condizioni in passato impensabili.

In Italia, ogni giorno, **vengono diagnosticati almeno 30 nuovi casi di tumore in pazienti di età inferiore ai 40 anni** (pari al 3% dei tumori), **con netta prevalenza per il sesso femminile** (4.897 donne *vs.* 2.931 uomini). Nelle donne, il tumore più frequente è il carcinoma della mammella a cui seguono i tumori della tiroide, il melanoma, il carcinoma del colon-retto e della cervice uterina e le malattie ematologiche, molto meno diffuse rispetto alle altre ma che colpiscono maggiormente le giovanissime. Negli uomini, invece, il tumore più frequente è quello del testicolo, seguito da melanomi, linfomi di Hodgkin, tumori del colon retto e della tiroide (Fonte AIOM-AIRTUM 2016).

Il Ministero della Salute ha recepito già dal 2015 il **Piano Nazionale per la Fertilità** in cui promuove la preservazione della fertilità nel paziente oncologico considerandola parte integrante del percorso di cura. Anche le più importanti società scientifiche internazionali hanno fatto proprio il concetto di tutela e conservazione della fertilità nel paziente oncologico: l'European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) ha costituito un gruppo dedicato all'oncofertility care. Anche le società americane di oncologia clinica (ASCO) e di medicina riproduttiva (ASRM) raccomandano il counselling sul desiderio di maternità/paternità in giovani pazienti e la possibilità di preservare la fertilità al momento della diagnosi di una patologia tumorale.

La perdita o la riduzione della fertilità dipende da diverse condizioni. Innanzitutto, dall'età di insorgenza della malattia tumorale, poi dal sesso del soggetto colpito (nell'uomo è più semplice preservare la fertilità), dalla sede del tumore (i tumori genitali pongono naturalmente delle difficoltà in più così come i tumori con sensibilità ormonale), dalla terapia necessaria e dalla precedente infertilità (ad esempio, una coppia con precedente infertilità avrà una prognosi diversa anche in caso di preservazione della fertilità).

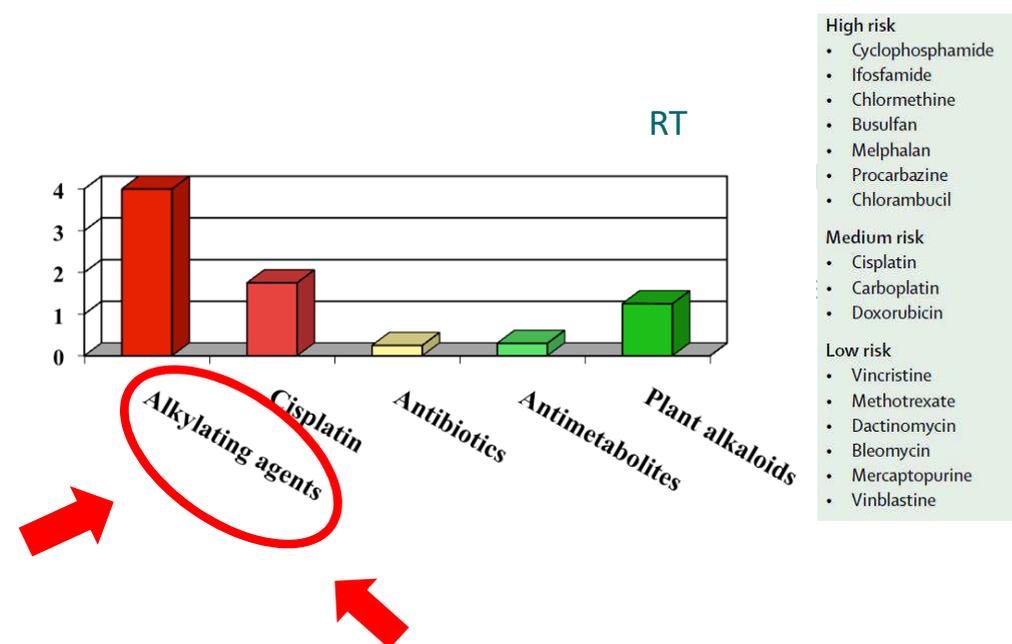
In caso di chemioterapia, il danno dipende dall'età, dalla riserva ovarica, dai farmaci e dall'eventuale radioterapia associata. Più giovane è la donna, e di conseguenza più ricca è la sua riserva ovarica, minore è il danno che la paziente subirà dalle terapie e maggiore la possibilità di recupero della fertilità. Nelle donne in età più avanzata e con una riserva ovarica più bassa, invece, vi è un maggiore rischio che la terapia possa danneggiare le ovaie al punto da determinare una menopausa iatrogena.

Gli **agenti alchilanti** sono i farmaci chemioterapici più dannosi perché il loro meccanismo d'azione interviene direttamente sull'integrità del DNA della cellula tumorale. A seguire il **cisplatino** e altri farmaci, come indicato in **figura 18**.

Per quanto riguarda la **radioterapia**, l'intensità del danno è strettamente dipendente dalla dose. A basse dosi di 150 RAD non si riscontrano conseguenze, **a dosi tra 500 e 800 RAD il 70% delle pazienti perde la funzionalità ovarica, mentre al di sopra di 800 RAD tutte le pazienti diventano permanentemente sterili**. Anche la sede di esposizione alla radioterapia è un punto cruciale. Naturalmente una radioterapia cerebrale causerà a livello ovarico meno danni rispetto a una radioterapia pelvica. In alcuni casi di radioterapia pelvica possono essere proposte tecniche come la trasposizione dell'ovaio, ovvero il suo trasferimento in un'altra sede senza staccarlo dal suo peduncolo, per poi riposizionarlo dopo la radioterapia. Infine, anche il tempo di esposizione è strettamente legato al danno da radioterapia nonché lo stadio degli ovociti.

Come già accennato, tra le strategie di preservazione della fertilità nella donna vi sono le tecniche di crioconservazione degli ovociti, degli em-

© **Figura 18.** Gonadotossicità dei farmaci chemioterapici



brioni e del tessuto ovarico. **Per quanto riguarda gli embrioni, la crioconservazione è riservata esclusivamente alla coppia e in Italia è una procedura vietata.** La crioconservazione del tessuto ovarico è una tecnica ancora in fase sperimentale ed è più complessa in termini di recupero della fertilità ma l'unica possibile in età prepuberale. Infine, **la crioconservazione degli ovociti è la tecnica di preservazione principale, per la quale non vi sono vincoli legislativi ma solo di età post-puberale.**

In caso di patologia tumorale, il tempo a disposizione prima di intraprendere le cure oncologiche può essere un fattore limite alla possibilità di eseguire la crioconservazione degli ovociti: sono necessari infatti almeno 15 giorni di tempo per eseguire prima la stimolazione ovarica e poi la procedura stessa di crioconservazione. Nei casi in cui non si ha tempo a disposizione, le pazienti possono accedere, laddove possibile, alla crioconservazione del tessuto ovarico che richiede un tempo minore di 1-2 giorni. La rapida presa in carico della paziente oncologica è quindi un fattore fondamentale. La preservazione della fertilità deve sempre precedere le terapie oncologiche potenzialmente gonadotossiche.

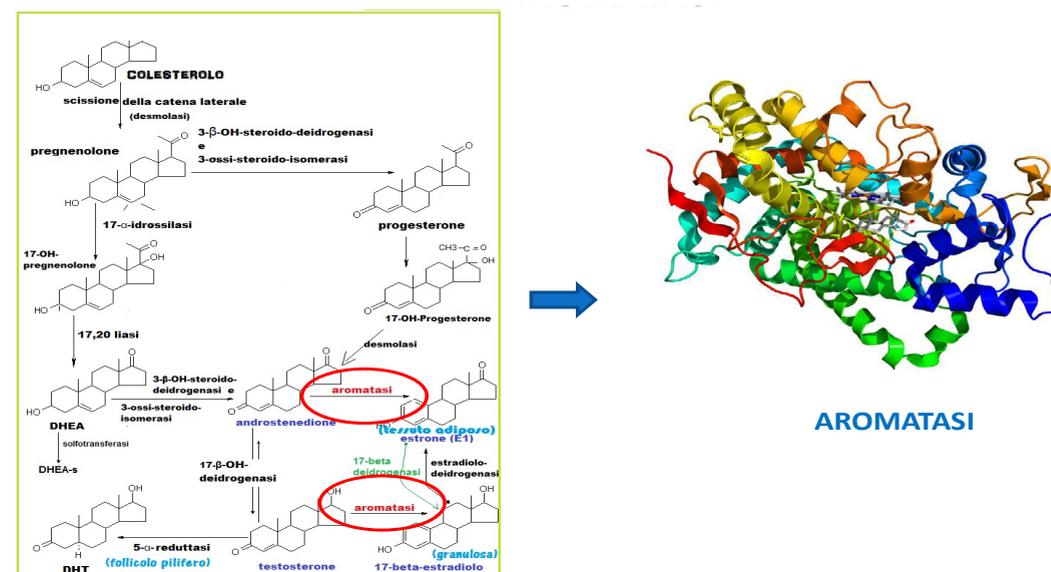
Il protocollo di stimolazione della paziente oncologica si differenzia rispetto alla fecondazione *in vitro* tradizionale. Nella fecondazione tradizionale, infatti, l'inizio della stimolazione coincide con la fase follicolare precoce per poter riprodurre in qualche modo il naturale ciclo ovarico, ma in certi casi questo potrebbe ritardare la procedura, determinando un ritardo eccessivo nell'inizio delle terapie oncologiche. Pertanto, nelle pazienti oncologiche si utilizza il cosiddetto **protocollo random start che inizia la stimolazione ovarica in qualsiasi momento del ciclo ovarico, senza ridurre significativamente il numero di ovociti prodotti**. Numerose evidenze dimostrano che il protocollo random start ha una buona resa in termini di numero di ovociti, non uguale a quelli ottenuti con protocollo standar nella fase follicolare precoce ma comunque sufficiente. Anche la qualità ovocitaria è risultata buona, sovrapponibile a quella che si ottiene stimolando la paziente nella fase follicolare precoce. Tuttavia, nel caso del protocollo di stimolazione random l'utero non sarà sincronizzato con l'ovaio come avviene nella stimolazione tradizionale, un limite superabile perché la paziente non dovrà effettuare un transfer dell'embrione ma soltanto recuperare gli ovociti.

Ancora più critico è il caso dei **tumori ormono-sensibili**, in particolare i tumori mammari, che possono presentare sensibilità agli estrogeni e al progesterone ovvero i due ormoni prodotti dall'ovaio che aumentano sensibilmente in caso di stimolazione ovarica. In queste pazienti, un protocollo ormai validato suggerisce l'impiego durante la stimolazione ovarica di **inibitori dell'aromatasi**, in particolare il **letrozolo** al dosaggio di 5 mg/die in abbinamento alle gonadotropine per ridurre la produzione di estradiolo.

L'aromatasi è un enzima chiave nella biosintesi degli estrogeni in quanto catalizza la reazione che a partire dal testosterone opera la sintesi di estradiolo (figura 19). Bloccando l'aromatasi si riducono sensibilmente i livelli di estradiolo rispetto a quelli fisiologici recuperando anche 10-15 ovociti. L'utilizzo di tali inibitori permette di poter sottoporre le pazienti alla stimolazione ovarica controllata senza il rischio di stimolazione contestuale significativa delle cellule tumorali.

L'utilizzo di protocolli personalizzati per la paziente oncologica e per la

© **Figura 19.** Biosintesi degli estrogeni e meccanismo d'azione dell'aromatasi



diversa tipologia di tumore consente oggi di poter programmare una maternità a un gruppo di pazienti che, grazie anche alla maggior sopravvivenza dopo la patologia oncologica, fino a pochi anni fa era completamente escluso dal “sogno” di guarire e di procreare. Le possibilità di cura e di preservazione della fertilità hanno dimostrato di avere un notevole impatto anche psicologico che migliora la prognosi di queste pazienti.