

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Scuola di Medicina e Chirurgia
Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia
Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino
Direttore: Prof.ssa Liviana Da Dalt



TESI DI LAUREA

**VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ OVARICA IN PAZIENTI
PEDIATRICHE SOTTOPOSTE A TRAPIANTO DI MIDOLLO**

Relatrice: Prof.ssa Alessandra Andrisani

Correlatore: Dott. Loris Marin

Laureanda: Benedetta Negri

Matricola n. 1128342

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUZIONE.....	5
1 PATOLOGIE EMATOLOGICHE IN ETÀ PEDIATRICA.....	5
1.1 Patologie ematologiche maligne.....	5
1.1.1 LLA.....	5
1.1.2 LMA.....	7
1.1.3 Linfomi.....	8
1.2 Patologie ematologiche non maligne.....	9
1.2.1 Drepanocitosi.....	9
1.2.2 Anemia di Blackfan-Diamond.....	10
1.2.3 Anemia di Fanconi.....	11
1.2.4 Anemia aplastica severa.....	11
1.2.5 Talassemia major.....	12
1.2.6 Sindrome Schwachman-Diamond.....	13
2. TRATTAMENTO.....	13
2.1 Chemioterapia.....	14
2.1.1 Tossicità gonadica.....	16
2.2 Radioterapia.....	19
2.2.1 Tossicità gonadica.....	20
2.3 TCSE.....	22
2.3.1 Trapianto allogenico.....	22
2.3.2 Condizionamento.....	24
2.3.3 Trapianto autologo.....	25
2.3.4 Complicanze.....	25

3. RUOLO DELLA PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ.....	26
3.1 TECNICHE CRIOCONSERVAZIONE.....	28
3.1.1 Crioconservazione embrionale.....	28
3.1.2 Crioconservazione di ovociti.....	29
3.1.3 Crioconservazione tessuto ovarico.....	29
3.1.4 Maturazione in vitro degli ovociti.....	30
3.1.5 Ooforopessi.....	30
3.1.6 Schermatura ovarica.....	31
3.1.7 Soppressione ovarica con analoghi GnRH.....	31
SCOPO DELLO STUDIO.....	32
MATERIALI E METODI.....	33
RISULTATI.....	37
1. VALORI ORMONALI.....	38
1.1 Pre-trattamento.....	38
1.2 Post-trattamento.....	38
1.3 Radioterapia e valori ormonali.....	39
2. Funzionalità ovarica.....	43
2.1 Radioterapia e funzionalità ovarica.....	45
3. Preservazione della fertilità.....	45
4. Insorgenza di gravidanze.....	45
DISCUSSIONE.....	47
CONCLUSIONE.....	52
BIBLIOGRAFIA.....	53

RIASSUNTO

Background

Le malattie ematologiche sono patologie frequenti in età pediatrica. In particolare, tra le maligne troviamo le leucemie (tra le più frequenti troviamo la linfoblastica acuta e la mieloide acuta), che costituiscono un terzo delle diagnosi di neoplasia in questa popolazione. Le patologie ematologiche benigne sono soprattutto emoglobinopatie (drepanocitosi, β -talassemia) ma anche forme come le aplasie midollari (anemia aplastica severa, anemia di Blackfan Diamond). Le terapie per queste patologie, tra cui il trapianto di midollo, hanno conseguenze negative importanti sul paziente; nello specifico il trapianto di midollo consiste in una terapia di condizionamento che prevede polichemioterapia associata o meno a TBI, che compromette la funzionalità ovarica delle pazienti, dovuta sia ad un danno primitivo dell'ovaio che ad un danno dell'asse ipotalamo-ipofisi.

Scopo dello studio

Lo scopo dello studio consiste nel valutare la funzionalità ovarica ed endocrinologica e valutare l'outcome riproduttivo di queste pazienti sottoposte in età pediatrica a terapia gonadotossiche per il trapianto di midollo.

Materiali e metodi

Lo studio condotto è di tipo retrospettivo monocentrico. Ha incluso le pazienti femmine sottoposte a trapianto di midollo presso l'UOC di Oncoematologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera di Padova, tra il 9 Marzo 2010 e l'11 Agosto 2020. I dati sono stati raccolti tramite la consultazione delle cartelle digitali e cartacee delle pazienti. Le informazioni raccolte, inserite poi in un apposito database, riguardano la diagnosi posta, l'età al momento della diagnosi, la terapia di prima e seconda linea eseguita (ove eseguita), la terapia di condizionamento, la radioterapia (ove eseguita), le informazioni riguardanti la funzionalità ovarica (FSH, E2, menarca, cicli mestruali, terapia ormonale) sia prima del trattamento che ai follow up successivi. È inoltre stata indagata l'esecuzione della preservazione della fertilità e la storia di gravidanze.

Risultati

Il nostro studio ha osservato un aumento del valore medio di FSH post trattamento rispetto al dosaggio pre trattamento (da $8,8 \text{ U/l} \pm 27,2$ a $54,3 \text{ U/l} \pm 51,0$ dopo il trattamento). Questo è indice del peggioramento della funzionalità ovarica, confermato anche dalla percentuale di pazienti che vanno incontro a periodi di

amenorrea (81,3% del totale delle pazienti di cui abbiamo notizie riguardanti la regolarità dei cicli mestruali) e che necessitano di terapia ormonale (29,1%). Il 10,4% delle pazienti ha eseguito trattamenti per la preservazione della fertilità (in tutti i casi è stata eseguita la crioconservazione di tessuto ovarico). L'11,4% delle pazienti hanno ricevuto diagnosi di POI, ma considerando i valori di FSH questa percentuale potrebbe aumentare, ed arrivare al 30,4%, includendo tutte le pazienti con FSH maggiore di 25 U/l. Una paziente è andata incontro a gravidanza.

Confrontando poi le pazienti sottoposte a terapia radiante (TBI) con quelle che non hanno ricevuto radiazioni, notiamo come il delta FSH medio sia più elevato tra quelle sottoposte a TBI rispetto alle altre. Tuttavia, nonostante la differenza evidente di delta FSH nei due gruppi, possiamo considerare questa differenza non significativa in quanto in entrambi i gruppi i valori di FSH sono talmente elevati da poter considerare una ampia fetta delle pazienti in una condizione di insufficienza ovarica precoce (POI). Questo è confermato dalle percentuali di pazienti che hanno presentato amenorrea, che sono del tutto simili tra i due gruppi (17,2% nelle pazienti radio-trattate contro il 17% di quelle non trattate con radioterapia).

Conclusioni

Dal nostro studio emerge una riduzione della funzionalità ovarica nelle pazienti sottoposte a terapia di condizionamento per il trapianto di cellule staminali ematopoietiche, in linea con quanto riscontrato nella letteratura scientifica a riguardo. Sono necessari altri studi per identificare al meglio quali pazienti siano a maggior rischio gonadotossico, al fine di sottoporre queste pazienti a tecniche di preservazione della fertilità. Vanno inoltre sensibilizzati i genitori delle pazienti affinché prendano in considerazione il problema legato alla fertilità dei figli (problema legato non solo alla possibilità di concepire, ma anche alle conseguenze che una menopausa precoce ha sull'organismo), nonostante al momento della diagnosi si trovino in un momento molto difficile. È bene che la scelta dei genitori sia guidata dalle figure mediche più consone, attraverso un gruppo multidisciplinare che coinvolga pediatri, ginecologi esperti in fertilità, endocrinologi e psicologi.

ABSTRACT

Background

Hematologic diseases are frequent pathologies in pediatric population. We can divide these diseases in two main groups, the malignant one and the benign one. The most recurrent among the malignant hematologic disease are lymphoblastic acute leukemia and myeloid acute leukemia; these make up one third of the malignant diseases in children. Concerning the benign disease, the most frequent are sickle cell anemia, β -thalassemia, severe aplastic anemia and Blackfan-Diamond syndrome. All these pathologies share the same definitive treatment, which is hemopoietic stem cell transplantation (HSCT). This treatment consists in a gonadotoxic therapy called “conditioning” and in the infusion of HSC; conditioning involves poli-chemotherapy (with cyclophosphamide, busulfan, melphalan, treosulfan and others) and, in some cases, TBI. Conditioning may affect the ovarian function, due to primitive ovarian damage and to injury to the hypothalamic-pituitary axis.

Purpose of the study

The purpose of the study is to evaluate the ovarian function and the endocrinologic one, and to observe the reproductive outcomes in HSCT recipients who underwent treatments during the pediatric age.

Materials and methods

In this retrospective and monocentric study, we have included female patients who underwent HSCT in UOC Oncoematologia Pediatrica dell’Azienda Ospedaliera of Padua between the 9th of March 2010 and the 11th of August 2020. Data have been collected from paper and digital folders. The data collected were about the diagnosis, the age at the moment of diagnosis, first and second line treatment (when done), conditioning therapy, TBI and information about the ovarian function (FSH, E2, menarche, period, hormonal therapy). Other data concern fertility preservation and pregnancies.

Results

Our study observes an increase of the median value of FSH from pre treatment to post treatment (from 8,8 U/l \pm 27,2 to 54,3 U/l \pm 51 after treatment). This shows a decrease of the ovarian functioning. 11,4% of the patients has been diagnosed with POI (primary ovarian insufficiency), even if, considering the value of FSH

(higher than 25 U/l), we can consider 30,4% of the patients affected with POI. Only one patient got pregnant. However only 10,4% of the patients undergo fertility preservation (ovarian tissue cryopreservation in all the cases).

By comparing patients with TBI and patients without TBI we notice that delta FSH is higher in patients who underwent TBI. However, despite this difference, we can consider it non-significant since in both two groups the FSH values are so high that a huge part of the patients can be considered in a condition assimilable to POI.

Conclusion

Our study found a decrease of the ovarian function in patients who underwent conditioning before hemopoietic stem cell transplantation; this result agrees with scientific literature. Further studies are required to better identify which patients have higher risk of gonadic toxicity, in order to make them undergo fertility preservation treatment. Young patients' parents should be informed about the risk of gonadic toxicity and the implications that the treatments have on their future quality of life (premature menopause and its consequences) despite the delicate moment they are going through. Parents' choices should be guided by a multidisciplinary team, which should include a pediatrician, a gynecologist expert in fertility, an endocrinologist and a psychologist.

INTRODUZIONE

1 PATOLOGIE EMATOLOGICHE IN ETÀ PEDIATRICA

Negli ultimi cinquant'anni grazie al progresso scientifico ci sono stati, nel campo dell'ematologia pediatrica, degli enormi passi avanti per quanto riguarda la cura delle patologie ematologiche, soprattutto per quanto riguarda le patologie maligne. Si stima infatti che in questo lasso di tempo il numero di guarigioni da queste malattie in campo pediatrico è aumentato dell'80%. Questo è avvenuto grazie ad un avanzamento non solo in campo oncologico, ma anche radiologico (per quello che concerne la diagnosi), genetico, terapeutico, in particolare per lo sviluppo di nuovi trattamenti basati sull'immunoterapia e per il miglioramento della tecnica per il trapianto di cellule staminali emopoietiche, sempre più utilizzato non solo per le patologie ematologiche maligne, ma anche per le benigne.

Visto il grande allungamento della vita media dei pazienti guariti da queste patologie, è bene soffermarsi ad analizzare quale sia la qualità della vita di questi soggetti, soprattutto in relazione agli effetti a lungo termine che le terapie alle quali sono stati sottoposti in età pediatrica hanno sulla vita adulta. In particolare, analizzeremo l'impatto che il trapianto di midollo in età pediatrica (nello specifico le terapie in preparazione al trapianto vero e proprio) ha sulla funzionalità ovarica.

1.1 Patologie ematologiche maligne

Le patologie ematologiche si possono classificare in due grandi categorie, maligne e non maligne. Le maligne (rientranti nella macro categoria delle patologie oncoematologiche) sono malattie neoplastiche che coinvolgono elementi cellulari presenti a livello del circolo ematico, ossia la parte corpuscolata del sangue. Le leucemie sono in generale la patologia neoplastica più frequente nel paziente pediatrico, rappresentando il 33% del totale delle neoplasie. In particolare, le più comuni sono la leucemia linfoblastica acuta (LLA), che rappresenta all'incirca il 75-80% dei casi di leucemia nel paziente pediatrico, la leucemia acuta mieloide (LAM), che rispetto al totale costituisce il 20-25% e la leucemia mieloide cronica (LCM) che corrisponde al restante 5%. (1) I linfomi invece, sono meno frequenti delle leucemie, e rappresentano l'8% del totale delle neoplasie.

1.1.1 Leucemia linfoblastica acuta (LLA)

La leucemia linfoblastica acuta colpisce di 3-4 bambini di razza caucasica ogni 100000, con 2500-3000 nuove diagnosi all'anno negli USA. L'incidenza ha un picco tra i 2 e i 5 anni di età. (2) La LLA è una malattia clonale neoplastica che origina dai progenitori linfoidi immaturi. Deriva nell'80% dei casi da dei precursori della linea B, mentre nel restante 20% dai precursori della linea T. (3) L'eziologia è sconosciuta, ma sono stati individuati alcuni fattori predisponenti, come le radiazioni ionizzanti, farmaci (in particolare gli agenti alchilanti), sostanze chimiche (ad esempio il benzene) e alcune sindromi (come la trisomia 21, l'anemia di Fanconi); si ipotizza ci possa essere una predisposizione genetica, in quanto figli di genitori affetti da LLA hanno un rischio di svilupparla a loro volta quattro volte maggiore rispetto alla popolazione generale. La maggior parte dei casi di LLA sono comunque dovute ad alterazioni genetiche somatiche, solo una minima invece è dovuta a predisposizione genetica ereditaria. Dal punto di vista citogenetico il 75% dei bambini affetti da LLA presentano una traslocazione cromosomica, che caratterizza la malattia non solo dal punto di vista biologico, ma ha da quello prognostico. Tra le traslocazioni più frequenti nella LLA troviamo: Tel-AML1 t(12;21), caratteristico del 22% dei casi pre-B e associato a prognosi eccellente, BCR-ABL1 t(9;22), presente nel 3% dei casi nella LLA del bambino (nel 25% invece nell'LLA dell'adulto), con prognosi infausta (alla diagnosi spesso c'è già coinvolgimento del SNC). La traslocazione t(9;22) è caratteristica invece della leucemia mieloide cronica dell'adulto, nella quale viene riscontrata in oltre il 90% dei casi e comporta la formazione del cromosoma Philadelphia; nella LLA però la formazione del cromosoma Philadelphia avviene solamente nella metà dei casi di traslocazione t(9;22), in quanto nell'altra metà la rottura del gene BCR avviene più prossimalmente, portando alla formazione di un trascritto diverso. Altre traslocazioni frequenti nella LLA pediatrica sono E2A-PBX1 t(1;19), t(8;14) e t(2;8) che deregolano la funzione di MYC. In più del 50% dei casi di LLA a cellule T troviamo una mutazione attivante di NOTCH1. (4) Clinicamente il paziente con LLA si presenta con anemia, trombocitopenia e neutropenia (pancitopenia) a causa dell'infiltrazione midollare, con conseguenti sintomi, quali astenia, fatigue, diatesi emorragica, petecchie e infezioni ricorrenti. Nel 60% dei casi possono essere riscontrate linfoadenomegalia, splenomegalia ed epatomegalia. Il trattamento generalmente prevede una terapia di induzione di quattro o sei settimane di terapia con vincristina, prednisone, L-asparaginasi e

antracicline, che porta alla remissione nel 95-98% dei casi. Va fatta poi la terapia di consolidamento con farmaci che prevengano la formazione di cloni di cellule resistenti ai trattamenti, con L-asparaginasi, ciclofosfamide, citarabina ed etoposide. La terapia di prevenzione delle recidive invece prevede metotrexate e mercaptopurina. Questi pazienti sono candidati al trapianto di cellule staminali emopoietiche quando c'è una forma citogenetica caratteristica o nei casi ad alto rischio dopo la prima o la seconda remissione. (5)

1.1.2 Leucemia mieloide acuta (LMA)

La leucemia mieloide acuta, nella popolazione pediatrica, ha incidenza minore della LLA, infatti ogni anno negli USA le nuove diagnosi di LMA sono circa 500, a fronte di un valore sono cinque o sei volte più grande per LLA. L'incidenza della malattia in età pediatrica è costante, eccetto per un picco nel periodo neonatale, e un aumento più modesto in adolescenza. La malattia consiste nell'alterata proliferazione e differenziazione delle cellule staminali emopoietiche e delle linee cellulari di derivazione mieloide, eritroide o megacariocitaria, avente una percentuale di blasti a livello midollare maggiore del 20%. (6) L'eziologia è sconosciuta, ma si ritiene probabile che per lo sviluppo della malattia sia necessaria la concorrenza di più fattori, quali l'esposizione a radiazioni ionizzanti, il trattamento con chemioterapici (come ad esempio ciclofosfamide, melphalan, etoposide) e la presenza di sindromi mielodisplastiche o mieloproliferative. È stata ipotizzata una predisposizione genetica nei soggetti affetti da patologie come la trisomia 21 (sindrome di Down), l'anemia di Fanconi, l'anemia Blackfan-Diamond e la sindrome di Bloom. Anche per LMA ci sono delle traslocazioni cromosomiche caratteristiche, che consentono di fare diagnosi senza la presenza di blasti maggiore del 20%; tra queste troviamo t(8;21) che crea il gene di fusione AML1-ETO causante il 15% delle LMA pediatriche, t(16;16) che genera la proteina chimerica CBFβ-MYH11 presente sempre nel 15% dei casi e t(15;17) caratterizzante la leucemia promielocitica acuta, data dalla formazione della proteina di fusione RARα-PML. (7) Per quanto riguarda il trattamento, fatto salvo per la forma promielocitica che prevede l'utilizzo di ATRA (all trans retinoic acid) ad alte dosi, nella LMA si eseguono terapie di induzione e consolidamento basate sull'utilizzo di citarabina e antracicline, per arrivare poi al trapianto di midollo allogenico. L'efficacia del trapianto è dovuta sia alla terapia di

condizionamento precedente a dosaggi sovramassimali, sia all'effetto graft-versus-leukemia (GVL), mediante il quale i linfociti T del donatore attaccano le cellule leucemiche. (8)

1.1.3 Linfomi

I linfomi in età pediatrica sono costituiti per il 60% dai linfomi non-Hodgkin e per il restante 40% da quelli di Hodgkin. (9) Rappresentano la terza forma di cancro più comune nei pazienti pediatrici dagli 0 ai 14 anni, e la prima nei pazienti dai 15 ai 19 anni.

I linfomi non-Hodgkin (NHL) rappresentano il 7% del totale delle neoplasie della popolazione nella fascia da 5 a 19 anni; in questa fascia d'età l'incidenza annuale è pari a 1040 casi negli USA. Questa incidenza negli ultimi due decenni si può considerare stabile nella fascia d'età dagli zero ai 15 anni, mentre dai 15 ai 19 si è registrato un incremento dei casi del 50%, portando ad un incremento complessivo del 13%. In tutte le classi d'età colpisce maggiormente la popolazione maschile. (10) NHL è definito come una proliferazione maligna delle cellule della linea linfoide, generalmente limitate ai tessuti linfoidei (quindi linfonodi, milza, placche di Peyer); il coinvolgimento midollare non è comune nei bambini, come la localizzazione primaria ossea e del SNC. Sono stati individuati diversi fattori di rischio, come difetti immunologici legati ad alterazioni genetiche, immunosoppressione post trapianto (sia per trapianto di organo solido che di midollo osseo), radiazioni e infezioni da agenti virali (come EBV, HIV, HTLV). Nel paziente pediatrico sono più frequenti le forme aggressive rispetto a quelle indolenti, al contrario di quello che succede nell'adulto. (9) Le tipologie di LNH più frequenti nel paziente pediatrico sono il linfoma di Burkitt, il linfoma diffuso a grandi cellule B e linfoma linfoblastico. (11)

Il linfoma di Hodgkin (HL) costituisce l'8,8% di tutte le neoplasie dei soggetti con meno di vent'anni. In questa fascia d'età l'incidenza negli USA è pari a 12,1 casi per milione di abitanti, ma nella fascia tra i 15 e i 19 anni l'incidenza sale a 32 casi per milione di abitanti; questo incremento è dovuto alla diffusione tra gli adolescenti di EBV, principale fattore predisponente per la comparsa di questa neoplasia. Oltre ad EBV un altro fattore predisponente è la familiarità per il linfoma di Hodgkin stesso. Questo linfoma è caratterizzato dalla presenza delle cellule di Reed-Sternberg, derivanti da cloni neoplastici originati da linfociti B nei centri germinali dei linfonodi, ma queste sono solo l'1% del tessuto neoplastico; il

restante è un ambiente eterogeneo costituito da linfociti, istiociti, plasmacellule, monociti. (12) Il linfoma di Hodgkin si presenta nella maggior parte dei casi con linfadenomegalia e sintomi di tipo B, quindi febbre maggiore di 38°C, calo ponderale nei precedenti 6 mesi (maggiore del 10% rispetto al peso basale) e sudorazione notturna; spesso si trova un'associazione con la comparsa di prurito generalizzato. Ci possono essere sintomi diversi in base alla zona caratterizzata da linfomegalia. (9)

1.2 Patologie ematologiche non maligne

Le patologie ematologiche non maligne sono una macrocategoria di patologie comprendenti al loro interno malattie molto eterogenee. Abbiamo per esempio malattie facenti parte del gruppo delle emoglobinopatie, come la drepanocitosi e la talassemia major, delle anemie come l'anemia di Fanconi e aplasie come la Blackfan-Diamond e la anemia aplastica severa. Hanno in comune con le patologie maligne sopra trattate un tipo di trattamento, ossia il trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

1.2.1 Drepanocitosi

La drepanocitosi, o anemia falciforme, è la più comune emoglobinopatia negli USA, dove arriva ad avere un'incidenza di 1 caso su 600 afroamericani. Infatti, in questa porzione di popolazione il trait falciforme (mutazione in eterozigosi) è presente nell'8% dei soggetti. È stimato che il 75% dei casi di nuovi nati con drepanocitosi sia localizzato nell'africa subsahariana. La malattia è data da una mutazione puntiforme del gene della β -globina, posto sul cromosoma 11, dove troviamo la sostituzione di un acido glutammico con una valina a livello del codone 6; questa mutazione darà origine all'emoglobina S (Hb S). Si tratta di una patologia a trasmissione autosomica dominante, per tanto la malattia conclamata sarà diagnosticata ai soggetti aventi entrambi gli alleli per la β -globina con la mutazione caratteristica, i cui globuli rossi conterranno una percentuale di HbS maggiore del 75%; nei portatori in eterozigosi della malattia invece, la percentuale di emoglobina patologica arriva al 20-45%. I soggetti portatori della mutazione di eterozigosi, del tutto asintomatici, nel corso della storia hanno avuto il vantaggio di risultare immuni all'infezione del *Plasmodium falciparum* (malaria), questo è il motivo per cui la mutazione in eterozigosi, e di conseguenza anche la

drepanocitosi conclamata, è molto frequente nella zona del bacino del mediterraneo e nel continente Africano, dove la malaria era più diffusa. Caratteristica dell'emoglobina S è il riarrangiamento della sua struttura quaternaria; questo porta alla polimerizzazione dell'emoglobina S, con modificazione della conformazione del globulo rosso, che assume la tipica forma a falce, responsabile dell'emolisi cronica e dei fenomeni di vaso-occlusione con ischemia tissutale che si verificano quando il soggetto si trova in condizioni di carenza di ossigeno, di abbassamento del pH ematico e di innalzamento della temperatura corporea (per infezioni o altro). Questo si verifica solo quando l'Hb S rappresenta più del 50% dell'emoglobina eritrocitaria, per tanto non avviene nel soggetto con mutazione in eterozigosi. (13) La terapia per la forma omozigotica prevede la prevenzione di situazioni in cui sia favorita la falcizzazione e l'utilizzo di farmaci come l'idrossiurea, allo scopo di aumentare la concentrazione dell'HbF. Il trattamento definitivo consiste nel trapianto di cellule staminali emopoietiche allogenico.

1.2.2 Anemia di Blackfan-Diamond

L'anemia di Blackfan-Diamond è una patologia quasi esclusivamente dell'età pediatrica, infatti le diagnosi dopo i quattro anni sono rare. L'incidenza nella popolazione Europea è di circa 1 caso su 150000 individui, per tanto può considerarsi patologia rara. È una malattia a trasmissione autosomica dominante a penetranza variabile, ma le mutazioni caratteristiche sono state individuate solo nel 40-45% dei pazienti affetti da questa patologia, tanto che alcuni dei casi sono considerati sporadici. Geneticamente risulta associata ad alcune mutazioni delle proteine ribosomiali (RP), sia per le subunità ribosomiali piccole che per quelle grandi. Tra le mutazioni più frequenti troviamo RPS7, RPS17, RPS19 e RPL5, RPL11, RPL35A. In particolare, RPL5 e RPL11 si associano anche ad alterazioni craniofacciali. Si tratta di una anemia caratterizzata da aplasia della linea eritroide (pertanto è detta aplasia eritrocitaria pura congenita), in cui si ha la componente dei progenitori eritroidi molto sensibile all'apoptosi, ma con i livelli di piastrine e globuli bianchi nella norma. (14) Il trattamento della malattia prevede inizialmente una terapia di supporto con corticosteroidi e trasfusioni (le trasfusioni sono necessarie prima dell'anno di età nel 90% dei pazienti), con conseguente somministrazione di chelanti del ferro. La terapia definitiva è il trapianto di cellule

staminali emopoietiche; questo va considerato precocemente soprattutto nei pazienti pediatrici che hanno una stretta dipendenza dalle trasfusioni. (15)

1.2.3 Anemia di Fanconi

L'anemia di Fanconi è una anemia aplastica congenita, caratterizzata da trasmissione autosomica recessiva (raramente X-linked). La mutazione recessiva ha un'incidenza nella popolazione generale di un caso su 136000 nuovi nati, mentre in alcune popolazioni come gli ebrei Askenaziti arriva ad avere un'incidenza di 1 caso su 90 persone a causa dell'"effetto fondatore". (16) È definita come insufficienza midollare associata a multiple anomalie congenite e a predisposizione all'insorgenza di tumori (in particolare LMA, carcinoma squamocellulare di testa e collo, neoplasie del seno, rene, polmone, colon e altri).

Geneticamente sono stati individuati tredici geni responsabili di questa patologia, ma nel 90% dei casi essa è causata da una mutazione a carico di FANCA, C e G. Tutti i geni individuati sono coinvolti nella riparazione del DNA da danni causati da sostanze iatrogene come gli agenti alchilanti o altri tossici. L'anemia di Fanconi è caratterizzata da pancitopenia, che spesso porta ad anemia aplastica severa; l'emopoiesi residua solitamente è caratterizzata da displasia eritroide e mieloide. Sono caratteristiche anche le macchie color caffè latte a livello cutaneo e macchie ipopigmentate, l'agenesia del radio, microcefalia, ipogonadismo soprattutto maschile, bassa statura e alterazioni renali e cardiache. (17) Per quanto riguarda il trattamento, la somministrazione di androgeni porta ad un miglioramento dei valori degli eritrociti e delle piastrine in più del 50% degli individui; il fattore di stimolazione G-CSF fa migliorare la conta dei neutrofili, ma il trapianto di cellule staminali emopoietiche è l'unico trattamento definitivo per le manifestazioni ematologiche, con miglior outcome se effettuato prima della degenerazione maligna e aplastica. (18) Per i pazienti affetti da anemia di Fanconi con insufficienza midollare, la sopravvivenza ad un anno dal trapianto di midollo è dell'80% nella popolazione generale, ma se effettuato entro i dieci anni di età la percentuale sale al 91%. In questi casi la terapia di condizionamento prevedeva solo chemioterapia, in assenza di radiazioni. (19)

1.2.4 Anemia aplastica severa

L'anemia aplastica severa (AAS) è una condizione acquisita nella quale il midollo osseo si presenta ipocellulare, con una cellularità minore del 25%, e a livello ematico ci siano almeno due caratteristiche tra granulocitopenia, trombocitopenia

e reticolocitopenia. L'incidenza in Europa è di due casi per milione di abitanti all'anno, mentre nel Sud-Est Asiatico è circa il triplo. (20) La causa non sempre è riconoscibile: infatti nel 70% dei casi è idiopatica, mentre nel restante 30% è secondaria a diverse condizioni, quali contatto con sostanze chimiche (benzene, toluene), radiazioni ionizzanti, farmaci, agenti virali (parvovirus B19, citomegalovirus, EBV), patologie immunologiche. In rari casi è stata riconosciuta una forma ereditaria. Il meccanismo del danno a livello midollare è immunomediato, con linfociti autoreattivi che mediano la distruzione delle cellule staminali emopoietiche. Il trattamento prevede il trapianto di cellule staminali emopoietiche, immunosoppressione, in particolare con globuline antitimociti (ATG) e ciclosporina, e ciclofosfamide ad alte dosi. (21)

1.2.5 β Talassemia major

La β talassemia major è una patologia emoglobinica a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata da una incidenza annuale in Europa pari a un caso ogni 10000 abitanti. La distribuzione non è uniforme, in particolare si riconosce un aumento dell'incidenza soprattutto nel Sud-Est Asiatico e nella zona del Mediterraneo Orientale. (22) Viene diagnosticata solitamente entro i due anni d'età, in pazienti con anemia importante, ritardi di crescita e pallore. La malattia è caratterizzata da mutazioni a carico delle catene β dell'emoglobina, che causa la riduzione della produzione (β^+) o la totale assenza di queste catene (β^0).

Normalmente l'emoglobina dell'adulto è composta da due catene α e due catene β (Hb A), ma in carenza o totale assenza delle catene β , questo tipo di emoglobina normale è assente o fortemente diminuita. Ci sono diversi tipi di talassemia, classificate a seconda della quantità di globine β presenti: β^0/β^0 (assenza completa di HbA), β^0/β^+ o β^+/β^+ (con Hb A presente in percentuale bassa, tra il 15 e il 25%). La forma più grave della malattia è presente quando vi è la totale assenza di catene β , ossia quando la mutazione è presente in omozigosi. Quando la mutazione è presente in eterozigosi (talassemia minor), il soggetto solitamente è asintomatico, ma i suoi globuli rossi sono frequentemente microcitici, e l'HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) è aumentata. La frequenza della mutazione in eterozigosi nella popolazione è dell'1,5%. (23) Il trattamento della forma major prevede il ricorso a trasfusioni, anche frequenti, che spesso portano il paziente ad un sovraccarico di ferro, con

conseguente necessità di terapia chelante. L'alternativa migliore, soprattutto nei pazienti al di sotto dei 14 anni è il trapianto di cellule staminali emopoietiche. (24)

1.2.6 Sindrome di Schwachman-Diamond

La sindrome di Schwachman-Diamond è una rara patologia autosomica recessiva, con un'incidenza nella popolazione di un caso su 76000 abitanti. (25) Si manifesta già dall'infanzia con insufficienza del pancreas esocrino (è la seconda patologia per frequenza che causa insufficienza del pancreas esocrino, dopo la fibrosi cistica), anomalie scheletriche e disfunzione midollare. Nel 90% dei casi è correlata alla mutazione del gene SBDS nel cromosoma 7, implicato nella funzionalità ribosomiale, ma di cui ancora non è stato ancora identificato il preciso ruolo. Dal punto di vista ematologico la sindrome è caratterizzata da leucopenia, con conseguenti infezioni batteriche e virali ricorrenti, trombocitopenia, con diatesi emorragica e sanguinamenti, e anemia microcitica in più dell'80% dei pazienti. Il trattamento è inizialmente di supporto, con somministrazione di enzimi pancreatici e fattori di crescita (G-CSF) per stimolare il midollo, ma quando la malattia evolve verso aplasia midollare o verso forme maligne (in particolare leucemia mieloblastica acuta) è previsto il trapianto di midollo allogenico. (26)

2 Trattamento

Il trattamento per le patologie ematologiche in età pediatrica si differenzia a seconda che la patologia sia maligna o benigna. Per la patologia maligna si usano la chemioterapia e la radioterapia, mentre per le patologie benigne in generale si usano terapie di supporto, come ad esempio le trasfusioni, ma non è previsto l'uso di chemioterapici o radiazioni. Tuttavia, c'è un tipo di trattamento comune ad entrambe le categorie di patologie: il trapianto di cellule staminali emopoietiche (TCSE). Questo tipo di trattamento consiste nella sostituzione dei progenitori emopoietici malati con cellule sane, ma prima prevede la somministrazione di una terapia di condizionamento che implica l'uso di chemioterapici (spesso agenti alchilanti) ad alte dosi e in casi selezionati di radiazioni (solitamente total body), anche nei pazienti con patologia benigna.

La chemioterapia è usata per molte patologie neoplastiche, sia solide che ematologiche, anche nei pazienti pediatrici. In particolare nel paziente pediatrico è necessario soffermarsi sulla tossicità del trattamento non solo nell'immediato, ma anche nel lungo termine, dal momento che questo paziente una volta guarito ha

davanti a sé ancora innumerevoli anni di vita. È bene quindi considerare quale sarà la qualità della vita negli anni successivi, cercando di adottare tutte le strategie a disposizione per garantire al paziente la migliore vita possibile. Questo è ancora più evidente alla luce degli ultimi studi, che evidenziano come i tassi di sopravvivenza per la maggioranza delle neoplasie pediatriche sono migliorati del 10% negli anni '50 e al giorno d'oggi di più dell'80% al follow up a 5 anni e del 75% al follow up a 10 anni. (27)

2.1 Chemioterapia

La chemioterapia antitumorale è un trattamento che consiste nella somministrazione di farmaci che agiscono eliminando le cellule neoplastiche in maniera più o meno precisa, a seconda del tipo di farmaco utilizzato. Spesso si tende a somministrare una polichemioterapia, ossia trattare il paziente con più farmaci aventi meccanismo d'azione differente ottenendo un effetto sinergico, al fine di evitare l'insorgenza di cloni neoplastici resistenti ad alcuni trattamenti, che risulterebbero difficilmente eliminabili successivamente con terapie di seconda linea.

I farmaci chemioterapici si dividono in diverse classi a seconda del meccanismo d'azione. In generale abbiamo:

- **Agenti alchilanti:** agiscono primariamente bloccando la sintesi del DNA, quindi inibendo anche la trascrizione del mRNA e la sintesi proteica. È la classe di farmaci responsabile della maggiore tossicità, in quanto agiscono sulle cellule a prescindere da quale sia la loro fase del ciclo cellulare. Agiscono creando cross-links sul DNA, che portano all'apoptosi. Esempi di questi sono ciclofosfamide, busulfano, melphalan, thiotepa, ifosfamide, cisplatino.
- **Antimetaboliti:** agiscono per incorporazione fraudolenta (sono falsi nucleotidi che una volta incorporati inducono un danno che attiva l'apoptosi) o inibendo enzimi implicati nella sintesi del DNA. Esempi di questi chemioterapici sono fludarabina, fluoruracile, metotrexato, capecitabina, citarabina.
- **Alcaloidi di origine vegetale:** sono detti anche veleni del fuso mitotico, perché bloccano la polimerizzazione e la depolimerizzazione del fuso mitotico. Esempi di questi: vinblastina, vincristina, taxani.

- Antibiotici antitumorali: agiscono in generale formando legami covalenti tra gli acidi nucleici. I più usati sono le antracicline, il cui meccanismo d'azione è legato all'inibizione della topoisomerasi II; particolarmente importante è la cardiotossicità di questi farmaci.

Altri tipi di farmaci utilizzati nelle neoplasie solide sono i farmaci a bersaglio molecolare (come anti-EGFR, anti-VEGFR, PARP-I), terapia ormonale e immunoterapia.

I trattamenti chemioterapici, a seconda del loro meccanismo d'azione, agiscono principalmente sulle cellule in proliferazione, in quanto le neoplasie sono costituite da cellule ad alta crescita. Questa caratteristica però è condivisa anche dai tessuti sani, in particolare il sistema ematopoietico, l'epitelio della mucosa gastro-intestinale, la cute, i bulbi piliferi, l'epitelio germinativo delle gonadi e il tessuto embrionale. Tutti questi tessuti, per tanto, saranno coinvolti negli effetti collaterali della chemioterapia, suddivisi in base al tempo di comparsa in immediati, precoci, ritardati e tardivi. Gli effetti immediati più diffusi sono nausea e vomito, flebiti e necrosi da stravasamento, rash e reazioni cutanee, disturbi del ritmo cardiaco e reazioni anafilattiche. Tra gli effetti precoci troviamo effetti sul sistema ematopoietico (anemia, trombocitopenia, neutropenia), alopecia, danni alle mucose (stomatite, diarrea). Tra quelli ritardati epatotossicità, neurotossicità, fibrosi polmonare, azospermia nell'uomo e amenorrea nella donna. Gli effetti tardivi consistono invece in sterilità, fibrosi polmonare ed epatica, cancerogenesi (comparsa di seconde neoplasie), cardiotossicità.

Generalmente la terapia per le malattie ematologiche, in particolare le maligne, di nuova diagnosi, prevedono come obiettivo dapprima l'induzione della remissione, poi il consolidamento e infine il mantenimento. Spesso i pazienti pediatrici in particolare vengono inseriti in protocolli sperimentali di trattamento, che prevedono l'utilizzo combinato di tre o più farmaci che agiscono in sinergia, i cui effetti tossici però andranno a sommarsi. Questi protocolli si differenziano soprattutto per l'aggressività della malattia, infatti spesso troviamo protocollo ad hoc per le patologie ad alto rischio. Nel caso della LLA, solitamente la remissione è indotta con un cortisonico (desometasone o prednisone), vincristina, L-asparaginasi, e profilassi per la diffusione della leucemia al SNC con metotrexate ad infusione intratecale. Questo approccio dà remissione di malattia nel 95% dei casi. In seguito, la terapia di consolidamento prevede l'utilizzo di 6-

mercaptopurina (immunosoppressore), vincristina e metotrexate intratecale, solo se alla diagnosi era presente diffusione della malattia al SNC. Per il mantenimento invece vengono somministrati desometasone, vincristina e metotrexate. Nei casi ad alto rischio può essere aggiunto alla terapia la citarabina e la mercaptopurina; per le recidive, invece la terapia viene aggiustata con l'aggiunta anche di agenti alchilanti come ciclofosfamide e la roxorubicina. (2) Per quanto riguarda la LMA di nuova diagnosi, i protocolli di terapia da adottare sono diversi; spesso in particolare l'indizione alla remissione causa nel paziente pediatrico un abbassamento delle difese immunitarie che lo espone notevolmente al rischio di infezioni, in particolare da parte di agenti micotici, che possono portare a quadri di sepsi. I farmaci maggiormente usati nei protocolli per la LMA sono etoposide, metotrexate, ciclofosfamide, busulfano, citarabina. Un trattamento da tenere in considerazione è il TCSE, che nel lungo termine porta ad una sopravvivenza del 70%, mentre i protocolli chemioterapici intensivi portano a remissione nel 92% dei casi, ma la sopravvivenza libera da malattia a 5 anni scende al 56%. (28) Per quanto riguarda i linfomi non Hodgkin, vengono trattati dal punto di vista chemioterapico con una polichemioterapia sistemica e una chemioterapia intratecale, per trattare o prevenire la diffusione al SNC. La polichemioterapia viene eseguita frequentemente secondo il protocollo COPAD, che prevede l'utilizzo di ciclofosfamide, vincristina, prednisone, doxorubicina e G-CSF, a cui può essere aggiunto metotrexate e citarabina a seconda della classe di rischio della malattia. (29)

Per il trattamento del linfoma di Hodgkin si utilizza la combinazione di chemioterapia e radioterapia a basse dosi. Le combinazioni di chemioterapici previsti dai protocolli per il linfoma di Hodgkin riguardano generalmente ciclofosfamide, vincristina, metotrexate, etoposide, doxorubicina ed altri. (30)

2.1.1 Tossicità gonadica

Tra gli effetti collaterali dei trattamenti con farmaci chemioterapici antitumorali si trova la compromissione della fertilità e quindi della funzionalità sia testicolare che ovarica. Questo aspetto non è da sottovalutare, in quanto la percentuale di adulti sopravvissuti ad una neoplasia riscontrata in età pediatrica è in continuo aumento, grazie alla maggior sopravvivenza data dai progressi portati dalle nuove terapie. Non tutti i chemioterapici hanno lo stesso rischio di compromettere la fertilità, in particolare quella femminile: i farmaci con rischio maggiore sono gli

agenti alchilanti (busulfano, melphalan, ciclofosfamide, ifosfamide), mentre un basso rischio è associato a metotrexate, fluoruracile, vincristina, bleomicina. Nella tabella sottostante (*Tabella I*) è illustrato il rischio di amenorrea permanente nelle donne trattate con chemioterapia e radioterapia, descritto nelle linee guida AIOM 2020 per la preservazione della fertilità nei pazienti oncologici. (31)

GRADO DEL RISCHIO	TRATTAMENTO
Rischio elevato (>80%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Trapianto di cellule staminali ematopoietiche con ciclofosfamide/irradiazione corporea totale (TBI) o con ciclofosfamide/busulfano ○ Radioterapia a fasci esterni che comprenda come campo di irradiazione le ovaie ○ CMF, CAF, CEF, 6 cicli in una donna >40 anni
Rischio intermedio	<ul style="list-style-type: none"> ○ CMF, CAF, CEF, 6 cicli in una donna tra i 30 e i 39 anni ○ AC o EC 4 cicli in una donna >40 anni ○ AC o EC à taxani
Rischio basso (<20%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ ABVD (doxorubicina/bleomicina/vinblastina/dacarbazina) ○ CHOP 4 o 6 cicli (ciclofosfamide/doxorubicina/vincristina/prednisone) ○ CVP (ciclofosfamide/vincristina/prednisone) ○ AML (antracicline/citarabina) ○ ALL (polichemioterapia) ○ CML, CAF, CEF 6 cicli in donna <30 anni ○ AC o EC 4 cicli in donna <40 anni
Rischio molto basso o assente	<ul style="list-style-type: none"> ○ Vincristina ○ Metotrexate ○ Fluoruracile
Rischio sconosciuto	<ul style="list-style-type: none"> ○ Oxaliplatino ○ Irinotecan ○ Anticopri monoclonali (trastuzumab, bevacizumab, cetuximab) ○ Inibitori tirosin-chinasi (imatinib, erlotinib)

Tabella I: rischio di amenorrea in pazienti trattate con chemioterapia e radioterapia (da linee guida AIOM 2020)

La compromissione della fertilità non dipende solo dal tipo di farmaco utilizzato, ma anche dalla dose e dalla posologia, dall'età e dal sesso del paziente e dall'utilizzo o meno in precedenza di altri trattamenti che possano aver influito sulla fertilità. (31) Per quanto riguarda l'età del paziente, si ritiene che più il soggetto è giovane meno danni avrà dal punto di vista della funzionalità ovarica (32). Il trattamento per il linfoma di Hodgkin è generalmente considerato più aggressivo di quello per il linfoma non Hodgkin (33). A conferma della tossicità degli agenti alchilanti, uno studio sul linfoma di Hodgkin ha dimostrato come in pazienti trattate con agenti alchilanti il rischio di insufficienza ovarica precoce (POI) fosse del 60%, contro il 3% delle pazienti trattate senza agenti alchilanti. (34)

La compromissione della fertilità nella donna è data da qualsiasi trattamento che riduca il numero di follicoli primordiali a livello ovarico, che colpisca l'equilibrio ormonale (anche influenzando l'attività dell'ipofisi), o che influisca sulla funzionalità dell'ovaio (compresa la loro vascolarizzazione), delle tube, dell'utero e della cervice. Un elemento da tenere in considerazione per la donna è il fatto che la fertilità può risultare compromessa anche se il ciclo mestruale risulta regolare, in quanto dopo un trattamento chemioterapico la donna può essere temporaneamente fertile, ma è a maggior rischio di menopausa precoce; per questo, la durata della fertilità può essere notevolmente ridotta rispetto a quella che può essere considerata fisiologica in relazione all'età anagrafica. (31) Questo avviene perché nelle ovaie, già al quinto mese di gestazione, c'è un numero definito di follicoli primordiali (il cui numero è diretto indicatore della riserva ovarica della donna), che nel corso della vita diminuisce via via, a causa della loro maturazione e del processo apoptotico a cui sono sottoposti, fino ad arrivare, di norma, ai 50 anni circa, quando questi follicoli sono in un numero talmente ridotto a livello dell'ovaio che la donna entra in menopausa. Con i trattamenti di chemio e radio terapia i follicoli a livello ovarico vengono danneggiati, subendo una riduzione, tanto maggiore quanto più tossica è la terapia, portando all'esaurimento dei follicoli e quindi alla menopausa in età precoce. (32)

Le ipotesi riguardanti il meccanismo alla base del danno ovarico sono diverse, tra cui troviamo l'apoptosi follicolare, la fibrosi corticale dell'ovaio e il burn-out follicolare. L'apoptosi follicolare sarebbe indotta dall'effetto del chemioterapico utile ad eliminare le cellule neoplastiche, che a livello follicolare causa danno a

livello della lamina basale. (32) Per quanto riguarda la fibrosi della corticale, essa è dovuta a ialinizzazione dei vasi e neovascolarizzazione; questo compromette la crescita e la sopravvivenza dei follicoli, concentrati soprattutto in quest'area. (35) Il burn-out follicolare, invece, è una teoria del tutto ipotetica, che si basa sul fatto che i chemioterapici causerebbero reclutamento dei follicoli primordiali attraverso attivazione del pathway PI3K a causa della distruzione dei follicoli maturi presenti in precedenza (si tratta di una sorta di meccanismo di compenso); viene indotta quindi la maturazione dei follicoli primordiali, che poi verranno distrutti come accaduto in precedenza. (36)

Clinicamente gli effetti sono vari: dall'insufficienza ovarica precoce (POI) con conseguente amenorrea, ai sintomi tipici del climaterio (periodo pre-menopausale con vampate di calore, sudorazione, secchezza vaginale, vaginiti, mal di testa, sbalzi pressori, tachicardia e palpitazioni transitorie), all'aumento delle gonadotropine (FSH e LH) e alla diminuzione degli estrogeni. (32)

2.2 Radioterapia

La radioterapia consiste nell'utilizzo di radiazioni ionizzanti al fine di danneggiare il genoma delle cellule neoplastiche per impedirne la replicazione. In particolare, il fascio di fotoni penetranti il tessuto da trattare, causa la formazione di radicali liberi che danneggiano il DNA delle cellule neoplastiche, le quali andranno incontro ad una morte per apoptosi.

Il danno indotto dalla radio terapia è duplice: c'è un danno diretto che la radiazione ha sul DNA cellulare, e uno indiretto, dato dalla formazione di ROS che andranno anche loro a danneggiare il genoma, portando la cellula alla morte. Ci sono diversi tipi di radioterapia, tra cui troviamo la radioterapia a radiazione esterna, nella quale la sorgente delle radiazioni è posta all'esterno del corpo, e quella a radiazione interna, suddivisa in brachiterapia (quando la fonte delle radiazioni posta prevalentemente nelle cavità corporee è solida) e la radioterapia eseguita mediante radionuclidi sistemici. (37) La radioterapia è utilizzata soprattutto per le neoplasie solide, spesso in associazione a chemioterapia, e per il linfoma di Hodgkin, sempre in associazione a chemioterapia. Il suo impiego può essere curativo-radicale, neoadiuvante, adiuvante o palliativo. Nel caso delle neoplasie solide si cerca il più possibile di eseguire una radioterapia mirata, al fine di danneggiare il meno possibile il tessuto sano circostante. L'irradiazione total

body (TBI) viene usata spesso nella terapia di condizionamento in preparazione al trapianto di cellule staminali ematopoietiche. In questo caso la radioterapia ha il compito non solo di eliminare le cellule maligne (soprattutto quelle localizzate negli organi “santuario” come il cervello), ma anche di immunosopprimere il paziente per prevenire il rigetto del trapianto.(38) Secondo alcuni studi i regimi di condizionamento che contengono la TBI hanno outcome migliori di quelli che non la prevedono, dando un vantaggio di sopravvivenza al paziente nel lungo termine. (39)

Come la chemioterapia, anche la radioterapia ha una serie di effetti collaterali legati al meccanismo d'azione che ha sulla neoplasia. Infatti, il danno indotto dalle radiazioni a livello del DNA delle cellule neoplastiche può ripercuotersi anche a livello del tessuto sano, soprattutto nel caso dell'irradiazione total body. In questo caso sono suddivisi, in base alla tempistica d'insorgenza, in precoci e tardivi; gli effetti collaterali precoci più frequenti sono radiodermiti, mucositi, affaticamento, infiammazione ed edema della zona irradiata, alopecia, secchezza delle fauci, mentre gli effetti collaterali tardivi sono principalmente radiodermiti tardive, fibrosi, radionecrosi, cancerogenesi (insorgenza di neoplasie secondarie al trattamento), infertilità. L'entità e la natura degli effetti avversi alla radioterapia dipende da molti fattori quali il campo d'irradiazione, il volume trattato, il frazionamento, il tasso di dose, il tempo totale di trattamento, e il tipo di tecnica utilizzata.

2.2.1 Tossicità gonadica

Di particolare interesse per la qualità di vita nel lungo termine del paziente pediatrico sopravvissuto ad una neoplasia trattato con radioterapia, è l'effetto di questa sulla fertilità. Fisiologicamente, alla nascita le neonate presentano circa 2 milioni di oociti, il cui numero si stabilizza già al quinto mese di gestazione. Questo numero diminuisce di anno in anno a causa della maturazione e dell'atresia fisiologica, fino ad arrivare ad un totale di circa 25 mila oociti all'età di 37-38 anni. Le radiazioni, come anche la chemioterapia, causa un danno al DNA, che porta alla perdita precoce degli oociti danneggiati con una riduzione ulteriore della riserva ovarica. Il danno ovarico ha come conseguenza non solo un raggiungimento anzi tempore della menopausa, ma anche un'alterazione dei livelli ormonali che si ripercuotono sulla struttura uterina. (40) Secondo il modello

matematico di Wallace et al. una dose di 2 Gy porterebbe alla perdita del 50% degli oociti immaturi. (41) Da altri studi è emerso come una dose di radiazione sull'ovaio tra i 5 e i 20 Gy sia sufficiente a causare una disfunzione gonadica permanente, indipendentemente dall'età della paziente, mentre una dose di 30 Gy causa una menopausa precoce nel 60% di donne al di sotto dei 26 anni. Per quanto riguarda la total body irradiation per il TCSE, emerge invece come causa di disfunzione gonadica permanente in oltre il 90% delle donne trattate, con incidenza di gravidanze post trattamento inferiore al 3%. (31) Le donne sottoposte a irradiazione della pelvi, oltre al danno ovarico e in parte anche a conseguenza di questo, presentano un rischio più alto di sviluppare complicanze in gravidanza rispetto alla popolazione generale. In particolare, possono presentare aumento della difficoltà nel concepimento, poliabortività, ritardo di crescita intrauterino (IUGR), basso peso alla nascita, alterazioni placentari e mortalità perinatale. (40) Le dosi di radiazioni che si sono viste essere dannose per l'utero si aggirano attorno ai 14-30 Gy. (42) Da studi eseguiti confrontando donne sottoposte a radioterapia durante l'infanzia e donne mai sottoposte a radioterapia, è emerso che le prime presentavano un utero di dimensioni ridotte e con più aree fibrotiche rispetto alle seconde. Inoltre, l'utero presentava alterazioni della vascolarizzazione, con riduzione della componente arteriosa, e l'endometrio non rispondeva correttamente allo stimolo di estradiolo e progesterone. La causa di queste alterazioni è da attribuire al danno microvascolare e all'alterazione ormonale. (43)

Oltre alla zona pelvica, di grande importanza per la fertilità è anche l'irradiazione della zona ipotalamo-ipofisaria, in particolare una dose tra i 22 e i 30 Gy causa una minore probabilità di gravidanza rispetto alla popolazione non irradiata. (31) L'irradiazione del distretto testa-collo può portare a iperprolattinemia, deficit delle gonadotropine e pubertà precoce, causando direttamente o indirettamente compromissione gonadica. (44)

Per quanto riguarda la dose delle radiazioni, è stato identificato il valore della dose sterilizzante effettiva (ESD), cioè la dose immediatamente dopo la quale il 97% delle pazienti presenta disfunzione ovarica. ESD decresce con l'aumentare dell'età della paziente: per le neonate è 20,3 Gy, a 10 anni è 18,4 Gy, a 20 16,5 Gy e a 30 14,3 Gy. Esiste comunque una discreta variabilità tra donne della stessa età. (45)

2.3 Trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE)

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) è una tecnica ormai affermata per trattamento di patologie ematologiche sia benigne che maligne, e in alcuni casi selezionati anche per tumori solidi. Al paziente da trattare vengono infuse cellule staminali ematopoietiche precedentemente prelevate o da un donatore (trapianto allogenico) o dal paziente stesso in fase di aplasia (autotrapianto). Prima di eseguire il trapianto vero e proprio, il paziente deve essere sottoposto alla terapia di condizionamento, con farmaci chemioterapici ad alte dosi e in alcuni casi con radioterapia (TBI), al fine di eliminare le cellule tumorali a livello midollare e immunosopprimere il paziente per non avere reazioni di rigetto. La terapia ad alte dosi di chemioterapici è composta da diversi farmaci usati in modo da agire in sinergia, per contrastare l'eterogeneità tumorale ed evitare l'insorgenza di resistenze. (46)

Il trapianto più comunemente eseguito, specialmente in età pediatrica, è il trapianto allogenico da un donatore HLA compatibile, come ad esempio un familiare (spesso un fratello); solo nel caso in cui nessun familiare sia compatibile si esegue una ricerca del donatore dal registro nazionale dei donatori di midollo (in quel caso il donatore è denominato MUD, matched unrelated donor).

Le indicazioni per il trapianto di midollo sono diverse a seconda che si tratti di trapianto allogenico o autotrapianto. Per il trapianto allogenico abbiamo:

- Patologie maligne: leucemia mieloide acuta, leucemia linfoblastica acuta, leucemia mieloide cronica, linfoma di hodgkin, linfoma non hodgkin, mielofibrosi, sindrome emofagocitica familiare
- Patologie non maligne: sindromi dell'immunodeficienza congenita, anemia falciforme, β -talassemia, anemia di Fanconi, anemia di Blackfan-Diamond, anemia aplastica severa, emoglobinuria parossistica notturna.

Le indicazioni per l'autotrapianto, invece, sono:

- Patologie ematologiche: linfoma non hodgkin, linfoma di hodgkin.
- Neoplasie solide: neuroblastoma, sarcoma di Ewing, rhabdomyosarcoma, neoplasie del SNC, tumore dei testicoli.

2.3.1 Trapianto allogenico di cellule staminali

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche viene eseguito mediante infusione di cellule prelevate da un donatore selezionato, che deve essere compatibile con il ricevente per il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Questo è composto dalle molecole di classe I (HLA-A, B e C) e quelle di classe II (HLA-DR, DQ, DP). Vengono eseguiti trapianti anche tra donatore e ricevente non completamente compatibili, purché la compatibilità ci sia per HLA-A, B, C e DR; si tratta in questo caso di donatori HLA-parzialmente compatibili. Il donatore è ricercato dapprima all'interno della famiglia (soprattutto fratelli e genitori), ma il riscontro positivo avviene solo nel 25-30% dei casi. Nella restante percentuale di casi il donatore è ricercato dall'elenco di donatori del midollo nazionale.

Ci sono diverse metodiche per ottenere le cellule staminali da trapiantare, dal più invasivo che corrisponde al primo metodo utilizzato in ordine di tempo, ai più innovativi e meno invasivi:

- Prelievo del sangue midollare dalle creste iliache: viene fatto il prelievo, in anestesia locale o più frequentemente generale, dalle creste iliache posteriori, attraverso prelievi multipli di circa 2 ml l'uno. Viene aspirato un quantitativo di materiale pari a 10-20 ml/kg del paziente da trapiantare, che corrisponde all'incirca a $2 \cdot 5 \cdot 10^8$ cellule per kg. Solitamente nel trapianto allogenico l'infusione viene effettuata entro poche ore dal prelievo tramite CVC, mentre nel trapianto autologo il materiale ottenuto dal prelievo viene conservato tra i -80 e i -139° C per un massimo di circa 10 anni. Questa metodica di prelievo è molto invasiva per il donatore, che dopo il prelievo avrà bisogno di alcuni giorni di convalescenza e di una copertura antidolorifica.
- Prelievo di cellule staminali emopoietiche da sangue periferico (PBSC): è una metodica più recente della precedente, nata dalla necessità di rendere il prelievo più agevole e meno invasivo per il donatore. Esso viene stimolato con un farmaco, il G-CSF, per circa cinque giorni per aumentare il numero di cellule staminali emopoietiche in circolo. Poi viene fatto il prelievo mediante aferesi, ossia viene prelevato il sangue dal donatore, viene "filtrato" dalla macchina che trattiene le cellule staminali emopoietiche, e la componente non utile del sangue viene ri-infusa al

donatore. Questo processo dura alcune ore, ma è notevolmente meno invasivo rispetto al prelievo dalle creste iliache.

- **Prelievo del sangue dal cordone ombelicale:** il sangue viene prelevato al momento della nascita, ed è poi crioconservato per essere usato nel caso in cui ci sia bisogno di un trapianto di midollo ma non sia disponibile un donatore. Il trapianto con questo tipo di materiale ha il vantaggio di essere meno allo-reattivo, e quindi presenta una incidenza minore di GVHD. (46)

2.3.2 Condizionamento

Il condizionamento è la terapia a cui viene sottoposto il ricevente nei quattro o cinque giorni immediatamente precedenti all'infusione delle cellule staminali emopoietiche. È fatto con lo scopo di eliminare le cellule della malattia, ma anche per preparare il paziente a ricevere delle cellule non-self, mediante l'induzione dell'immunosoppressione.

La terapia di condizionamento consiste nella somministrazione di due o tre chemioterapici usati a dosi ablative con aggiunta o meno di TBI. In particolare, nel trattamento per LLA si usano in genere ciclofosfamide e TBI; per la LAM si usa il condizionamento come per LLA oppure la combinazione di busulfano e ciclofosfamide. Per il linfoma non Hodgkin solitamente vengono usati farmaci come ciclofosfamide, etoposide, melphalan. Per l'anemia aplastica invece si usano ciclofosfamide e ATG, ossia le globuline anti timociti, o ciclofosfamide e TBI, o ciclofosfamide e busulfano. Per l'anemia di Fanconi, invece si usano ciclofosfamide, ATG e fludarabina.

Esiste un altro tipo di condizionamento oltre a quello ablativo, ossia quello non ablativo (o trapianto ad intensità ridotta). In questo caso è possibile somministrare al paziente dosi minori dei chemioterapici mieloablativi, con il vantaggio di avere meno effetti tossici. Questo regime affida ai linfociti T del donatore il compito di eradicare la malattia nel paziente.

Una delle problematiche più frequenti dopo il trapianto di midollo è la graft versus host disease (GVHD), che rappresenta la reazione delle cellule immuno-competenti del donatore contro i tessuti del ricevente. Questa reazione si sviluppa in circa il 35-50% dei pazienti sottoposti a TCSE, in particolare in seguito a quello allogenico. Si manifesta a livello di più organi, e spesso è necessario eseguire una biopsia per fare la diagnosi differenziale con altre patologie, come per esempio patologie virali in caso di epatite o patologie infettive in generale in caso di coliti.

Questa reazione è in realtà vantaggiosa per il paziente, perché le cellule attaccate sono anche quelle tumorali, quindi anche questo è d'aiuto all'eliminazione della malattia. Esiste una terapia di profilassi per la GVHD, che prevede l'utilizzo di ciclosporina, metilprednisolone, e metotrexate. (46)

2.3.3 trapianto autologo di cellule staminali ematopoietiche

Questo tipo di trapianto è da considerare soprattutto in caso di patologie maligne, come i linfomi. Le cellule staminali ematopoietiche vengono prelevate dal donatore, che coincide con il ricevente, e possono essere trattate ex vivo con farmaci citotossici o anticorpi monoclonali diretti verso le cellule neoplastiche; possono anche essere selezionate attraverso il marcatore CD34+, che è presente sulle cellule staminali. Queste cellule saranno crioconservate per un tempo massimo di circa dieci anni, e saranno poi infuse nel paziente quando necessario, assieme alla somministrazione di fattori di crescita.

2.3.4 complicanze del trapianto di cellule staminali

Le complicanze derivanti dal TCSE sono legate alla terapia di condizionamento e alla terapia immunosoppressiva per il mantenimento dell'immunosoppressione. Nell'immediato post-trapianto la complicanza più importante è dovuta soprattutto alla soppressione del sistema immunitario, in quanto il paziente sarà estremamente esposto ad infezioni batteriche (soprattutto streptococco pneumoniae) e ad infezioni opportuniste (CMV, herpes zoster, agenti micotici). Inoltre, questi pazienti in età pediatrica dovranno attendere per eseguire le vaccinazioni indicate dal calendario vaccinale, soprattutto quando si tratta di vaccini vivi attenuati. Un'altra complicanza molto frequente è la polmonite interstiziale, causata da diversi meccanismi, come infezioni da CMV, P. Jiroveci, agenti micotici, oppure farmaci, radiazioni, reazioni di autoimmunità. Nei primi quindici giorni dopo il trattamento, in particolare, il paziente sarà anche in uno stato di pancitopenia, quindi avremo anemia, trombocitopenia e neutropenia, che espone ulteriormente il paziente a una serie importante di complicanze di carattere infettivo. Si può manifestare anche la malattia veno-occlusiva, che comporta la fibrosi obliterante dei piccoli vasi epatici.

Nel lungo termine invece, possiamo avere GFVHD cronica, insufficienza renale, cardiomiopatia, osteonecrosi asettica, disordini endocrini, quali ipotiroidismo, ritardo della pubertà, deficienza dell'ormone della crescita, insufficienza

gonadica. Legato a quest'ultimo elemento c'è la possibilità concreta che il paziente trattato con TCSE risulti sterile una volta completato lo sviluppo puberale. In relazione a ciò, alcuni studi hanno evidenziato come l'incidenza di insufficienza ovarica precoce (POI) nella donna sottoposta a trapianto di midollo sia compresa tra il 44 e il 100%. (47) Particolare importanza sembra avere, oltre ai trattamenti mieloablativi eseguiti con chemioterapici, anche TBI, che tuttavia, se eseguita prima delle pubertà, presenta conseguenze meno drammatiche rispetto al risultato sulle donne adulte. Infatti, se somministrato prima delle pubertà TBI risulta meno gonadotossica, permettendo al 40-60% delle femmine prepuberi di completare la pubertà spontaneamente. (47)

3 Ruolo della preservazione della fertilità

Negli ultimi 50 anni, la sopravvivenza dei bambini a cui è stato diagnosticato un tumore continua ad allungarsi: in UK, i bambini che hanno ricevuto diagnosi di neoplasia tra il 2012 e il 2016, hanno una sopravvivenza a 5 anni dell'84%, quelli diagnosticati tra il 2007 e il 2011 hanno una sopravvivenza a dieci anni del 80%, e questa scende al 72% per i pazienti che hanno ricevuto diagnosi tra il 1997 e il 2001, quindi rappresenta la sopravvivenza ad oltre vent'anni. (48) Queste percentuali mostrano come sempre più bambini con diagnosi di neoplasia raggiungeranno l'età adulta, avendo diritto ad una qualità di vita pari a quella dei coetanei sani.

Uno dei fattori che determinano la qualità della vita è la possibilità di poter concepire quando lo si desidera, come testimoniato dallo studio che ha coinvolto giovani donne, tra i 18 e i 34 anni, sopravvissute al cancro; questo studio ha evidenziato come esse siano speranzose di potersi costruire una famiglia, ma allo stesso tempo siano preoccupate per la possibilità di non poter avere figli propri. (49)

È noto che le terapie antitumorali, chemioterapia, radioterapia, trapianto di midollo osseo, compromettono in maniera molto importante la fertilità, inducendo frequentemente nella donna una insufficienza gonadica, che non in tutti i casi è reversibile. Dati del CCSS (cancer care survivor study) testimoniano come il 6,3% delle ragazze sottoposte a terapie antitumorali sviluppi insufficienza ovarica acuta (AOF) immediatamente dopo il trattamento, e successivamente la percentuale delle pazienti con insufficienza ovarica precoce (POI) sale all'8%, contro lo 0,8% dei controlli sani.(50)

È importante evidenziare inoltre che la ricomparsa della mestruazione dopo la terapia non è da considerarsi conferma del ripristino della fertilità.

Tra i fattori che incidono sulla fertilità del paziente sottoposto a trattamento troviamo l'età del paziente (più giovane è il paziente minore sarà l'impatto), la dose di farmaco ricevuta, la durata del trattamento, il tipo di farmaci somministrati (gli agenti alchilanti sono tra i più dannosi a livello gonadico), il numero di farmaci usati in combinazione, l'utilizzo di irradiazione e il campo di irradiazione. Per quanto riguarda il trapianto di midollo è bene evidenziare come l'incidenza della insufficienza ovarica prematura dopo la sua esecuzione sia ancora più elevata rispetto alla POI conseguente a terapie antitumorali semplici, infatti essa arriva a colpire l'80% delle giovani donne sottoposte a trapianto di midollo, anche se effettuato in giovanissima età. (51)

Con l'avanzare degli anni nella donna è fisiologico che la riserva ovarica subisca un declino, fino ad arrivare al momento in cui il numero di follicoli antrali scende sotto una certa soglia per cui la donna entra in menopausa. Qualche tempo prima della menopausa, nel periodo perimenopausale, c'è un lasso di tempo in cui la conta follicolare è molto ridotta, ma il ciclo mestruale non ha ancora subito variazioni. Questo periodo di "subfertilità" può essere enormemente anticipato nelle donne che hanno ricevuto terapie antitumorali nel periodo dell'infanzia o dell'adolescenza, a causa della prematura riduzione della loro riserva ovarica. Il principale marcatore in grado di stimare la riserva ovarica è l'AMH (ormone anti-Mulleriano) prodotto dai follicoli ovarici dal loro stadio antrale. Uno studio, condotto su pazienti in età sia pre che post puberale, ha dimostrato come il valore dell'AMH cali drasticamente durante le terapie antitumorali, per poi risalire dopo la fine delle terapie, ma solo nelle pazienti che hanno ricevuto trattamenti a bassa tossicità. (52)

La carenza estrogenica tipica dell'insufficienza ovarica non ha ripercussioni solo sulla funzionalità ovarica stessa, ma impatta su altri organi a livello sistemico. Essa, infatti, condiziona la crescita uterina, ritarda lo sviluppo puberale, porta a difetti della crescita, aumenta il rischio di osteoporosi e di malattie cardiovascolari, altera le funzioni cognitive e influenza negativamente la sfera sessuale dell'individuo.

Alla luce di quanto detto, appare evidente come sia necessario adottare delle strategie atte a preservare la fertilità delle pazienti trattate con farmaci e

trattamenti in generale gonadotossici, e come ogni paziente, in base all'età e al percorso che dovrà affrontare, abbia bisogno in un counselling su misura.

3.1 Tecniche per la preservazione della fertilità

La preservazione della fertilità è un argomento da affrontare con le pazienti e i loro familiari prima dell'inizio dei trattamenti gonadotossici.

In generale esistono diverse tecniche per la preservazione della fertilità, suddivisi in metodi affermati, metodi sperimentali e metodi in discussione. Per la ragazza in età post-puberale, ossia che ha già manifestato il menarca, le metodiche che si possono usare per la preservazione della fertilità sono diverse, e rientrano per lo più nelle metodiche affermate; invece, per la paziente in età pre-puberale esistono solamente tecniche sperimentali, sebbene alcune di queste vengano ormai utilizzate su larga scala. La difficoltà nell'eseguire la preservazione delle pazienti pre-puberi sta nel fatto che esse hanno l'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio inattivo, e pertanto non hanno ovociti maturi a livello ovarico.

Tra le metodiche affermate troviamo: la crioconservazione degli embrioni e la crioconservazione degli ovociti; tra quelle sperimentali abbiamo la crioconservazione di tessuto ovarico (con successivo reimpianto) e la maturazione in vitro degli ovociti; tra i metodi in discussione ci sono la schermatura delle ovaie, la trasposizione di tessuto ovarico (ooforopessi) e la soppressione della funzionalità ovarica con analoghi del GnRH.

3.1.1 Crioconservazione degli embrioni

La crioconservazione degli embrioni è una metodica che prevede la formazione degli embrioni in vitro, il loro congelamento e il successivo scongelamento e transfer dell'embrione quando la paziente lo desidera. Inizialmente la paziente viene stimolata per dieci-quattordici giorni con gonadotropine per indurre la crescita follicolare multipla, e parallelamente vengono eseguiti dei controlli ecografici per monitorare la crescita dei follicoli ed aggiustare la terapia ormonale. Viene poi somministrato alla paziente un LHRH analogo, al fine di evitare l'ovulazione spontanea. Successivamente la paziente viene portata in sala operatoria per eseguire il pick-up ovocitario, con il quale vengono recuperati gli ovociti maturi. Questi vengono fecondati in vitro con i gameti del compagno della paziente, e il prodotto della fecondazione è poi conservato tramite vetrificazione. Questa tecnica presenta chiaramente dei limiti, il primo del quale è rappresentato dal fatto che per iniziare la stimolazione secondo il protocollo standard è

necessario attendere la comparsa del ciclo; questo però potrebbe ritardare troppo l'inizio della chemioterapia. Tuttavia, negli ultimi anni viene usato, nei casi in cui non sia possibile attendere la comparsa del ciclo, un protocollo di emergenza, che prevede la possibilità di iniziare la stimolazione in qualunque momento, ottenendo comunque risultati equiparabili. Altri limiti sono la necessità di un partner che fornisca il gamete maschile, il rischio di iperstimolazione, e il rischio nell'uso di ormoni nel caso di neoplasie ormono-sensibili. Con questa tecnica il tasso di nati vivi è del 27,7% per ciascun embrione crioconservato. (31) (53)

3.1.2 Crioconservazione degli ovociti

La crioconservazione degli ovociti è una tecnica del tutto simile alla crioconservazione degli embrioni, con una terapia iniziale di stimolazione e il pick-up ovocitario. La differenza principale sta nella non fecondazione dell'ovocita da conservare. Questa tecnica ha delle percentuali di successo tre o quattro volte più basse della conservazione degli embrioni (54), con un tasso di nati vivi pari al 3-6% per ogni ovocita. (53) Nonostante la minor efficacia, questa tecnica ha diversi vantaggi: non è necessario il coinvolgimento di un partner per la donazione dello sperma, in quanto gli ovociti saranno fecondati solo al momento dello scongelamento. Questo appare un enorme punto a favore di questa tecnica, dal momento che le pazienti sono spesso molto giovani.

3.1.3 Crioconservazione di tessuto ovarico

La crioconservazione di tessuto ovarico è un metodo che ad oggi risulta affermato per le pazienti adulte, mentre per le pazienti pre-puberi risulta ancora sperimentale, seppure abbia ormai un utilizzo abbastanza ampio. In particolare, nelle donne adulte questa tecnica va proposta qualora non sia possibile sottoporre la donna alla stimolazione per eseguire la crioconservazione di ovociti o embrioni (ad esempio quando non posso attendere il tempo necessario per la stimolazione, ma si deve iniziare il prima possibile con le terapie antitumorali), mentre nelle pazienti pre-puberi risulta essere l'unica metodica possibile. Negli ultimi anni appare sempre più evidente come sia possibile eseguire la crioconservazione di tessuto anche dopo una chemioterapia di prima linea, ottenendo risultati in termini di gravidanze del tutto simili a quelle in paziente non ancora trattate. (55) La procedura prevede un intervento in laparoscopia, nel quale può essere asportato un ovaio intero, oppure possono essere fatte numerose biopsie, in modo da conservare almeno un terzo di ciascun ovaio. La corticale dell'ovaio con i follicoli

primordiali viene crioconservata sotto forma di strisce di tessuto sottili. Nella maggior parte dei casi il reimpianto viene poi eseguito ortotopicamente o in laparoscopia o in laparotomia. Tra le maggiori preoccupazioni a riguardo di questa metodica troviamo la possibilità di reintrodurre cellule neoplastiche con il reimpianto. Ci sono tuttavia delle strategie per evitarlo: viene fatta un'attenta analisi pre operatoria e prima del reimpianto vengono eseguiti dei controlli istologici. (54)

Dopo il reimpianto la ripresa della funzionalità endocrina dell'ovaio si ottiene del 90-100% dei casi, tuttavia questa attività permane per un lasso di tempo ancora molto limitato, ossia circa 5 anni. Dati del 2018 attestano come più di 130 bambini siano nati grazie a questa metodica, di cui circa la metà è nata con concepimento spontaneo e l'altra metà con metodiche di PMA. (56) In generale, l'efficacia è attorno al 93% per quanto riguarda la funzionalità endocrina dell'ovaio e il tasso di nati vivi è del 32% per ogni trapianto. (57)

3.1.4 Maturazione in vitro degli ovociti

La maturazione in vitro degli ovociti sembra essere una tecnica promettente per l'ottenimento di ovociti maturi da ovaie non stimolate, come ad esempio nel caso in cui non sia possibile eseguire un ciclo di stimolazione o nel caso di pazienti pre-puberali. Gli ovociti immaturi recuperati vengono trattati per 24-48 ore in vitro fino a farli arrivare in metafase II, per poi essere fecondati in vitro o crioconservati. Questa metodica è ancora del tutto sperimentale, anche se negli ultimi anni sono stati fatti diversi progressi, tanto che alcuni studi testimoniano come i risultati di fecondazioni con ovociti maturati in vitro sino del tutto simili a quelli della fecondazione in vitro tradizionale. (58) La maturazione extracorporea degli ovociti, pur essendo ancora in sperimentazione potrebbe essere la chiave di volta per la preservazione della fertilità nella paziente pre-pubere.

3.1.5 Ooforopessi

La trasposizione ovarica, o ooforopessi, è una procedura per la preservazione della fertilità ancora oggi in discussione. Consiste nel riposizionamento dell'ovaio dalla cavità pelvica ad una sede nella quale sia più protetto dalle radiazioni ionizzanti a cui la paziente deve essere sottoposta. La procedura è eseguita con un intervento chirurgico, e dopo il trattamento la paziente può essere sottoposta nuovamente a riposizionamento dell'ovaio, impiantandolo a livello pelvico in quella che è la sua posizione fisiologica, oppure può esser lasciata nella sede eterotopica e ricorrere

alla PMA per concepire. Il tasso di successo di questa procedura è circa del 50% (59), a causa dell'alterazione del flusso ematico ovarico; inoltre, l'incidenza di POI dopo la trasposizione è circa del 50-90%. (40) È importante sottolineare come questa tecnica sia utile solamente nel caso di radioterapia, e non nel caso di chemioterapia antitumorale sistemica.

3.1.6 Schermatura ovarica

La schermatura ovarica (gonadal shielding) è una metodica di preservazione della fertilità che prevede l'utilizzo di elementi piombati a protezione dell'ovaio per ridurre la quantità di radiazioni che lo colpisce. Come l'ooforopessi, anche questa metodica è utilizzabile solamente nei casi di radioterapia, non quando la terapia prevede chemioterapia sistemica. Può essere considerata infatti un'alternativa alla trasposizione ovarica, e come essa è una metodica in via di discussione. (53)

3.1.7 Soppressione della funzionalità ovarica con analoghi del GnRH

Il GnRH sopprime indirettamente la funzionalità ovarica bloccando la produzione di gonadotropine da parte dell'ipofisi. Questa tecnica non protegge le ovaie dal danno inflitto dalle radiazioni ionizzanti, quindi dalla radioterapia, in particolare dalla TBI spesso usata nella terapia di condizionamento per il trapianto di midollo. In accordo con ASCO e ESMO, dovrebbero essere utilizzate altre tecniche diverse da questa, ove possibile. (53)

Alla luce dell'impatto della terapia antitumorale, nelle sue diverse forme, in particolare sui pazienti pediatrici, e in virtù delle possibilità esistenti per arginare il danno, e quindi l'impatto sulla qualità della vita futura del piccolo individuo, è bene valutare la possibilità di proporre trattamenti di preservazione della fertilità anche al paziente pediatrico. In relazione a ciò, è altresì importante approfondire l'esistenza di una correlazione tra le caratteristiche del paziente (come i livelli ormonali pre e post terapia, l'età, la patologia da cui è affetto), della terapia al quale è sottoposto e l'outcome nell'ambito della fertilità, come lo sviluppo puberale, la regolarità dei cicli e la comparsa di amenorrea.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è la valutazione dell'impatto dei trattamenti mielosoppressivi, e in particolare della terapia radiante, sulla funzionalità ovarica, e su quella endocrinologica e la valutazione dell'outcome riproduttivo delle pazienti affette da patologie oncoematologiche sottoposte a trapianto di midollo in età prepubere.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto presso l'Azienda Ospedale Università di Padova, nell'UOC Ginecologia ed Ostetricia. Sono state individuate le pazienti con malattie oncoematologiche, benigne e maligne, che sono state sottoposte a trapianto di midollo tra il 9 Marzo 2011 e l'11 Agosto 2020 presso la UOC Oncoematologia Pediatrica di Padova. Si tratta di uno studio retrospettivo eseguito mediante consultazione delle cartelle cliniche computerizzate e cartacee delle pazienti.

Le variabili analizzate sono la diagnosi, l'età al momento del trapianto di midollo, lo stato di sviluppo puberale al momento del trapianto, la tipologia di trattamento di prima linea e seconda linea (ove eseguito), la terapia di condizionamento, la radioterapia (ove eseguita), i valori ormonali pre trattamento (valutando FSH, 17- β estradiolo, e AMH ove dosato), i livelli ormonali post trattamento (FSH e 17- β estradiolo e AMH ove dosato), la funzionalità ovarica in seguito al trapianto (amenorrea, menarca spontaneo o indotto), l'utilizzo di terapia ormonale, le eventuali tecniche di preservazione della fertilità e la storia ostetrica (gravidanze sia tramite PMA che spontanee). I dati relativi alle gravidanze sono stati raccolti mediante i referti delle visite di follow up.

Tutti i dati relativi alle pazienti sono stati inseriti in un database apposito.

La popolazione oggetto di studio è stata selezionata tenendo conto dei seguenti criteri di inclusione e di esclusione:

Criteri di inclusione

- Sesso femminile
- Essere state sottoposte a trapianto di midollo per patologia oncoematologica
- Età inferiore a 12 anni al momento della diagnosi
- Aver ricevuto terapia per almeno un anno
- Essere sopravvissute oltre il dodicesimo anno di vita.

Criteri di esclusione

- Pazienti di età superiore ai 12 anni al momento della diagnosi
- Pazienti che non sono state sottoposte a terapie mielosoppressive e a trapianto di midollo per patologie ematologiche/oncoematologiche
- Pazienti che hanno dovuto ricevere terapie di tipo oncologico nell'ultimo anno

- Pazienti che al momento della diagnosi avevano già avuto il menarca.

Le patologie più frequentemente riscontrate nel campione sono la leucemia linfoblastica acuta (LLA), sia in prima che in seconda recidiva, la leucemia mieloide acuta (LAM), sia in prima che in seconda recidiva, alcuni linfomi, in particolare Non Hodgkin (LNH), la drepanocitosi, l'anemia aplastica severa (AAS) ed altre patologie in minor numero.

La terapia di prima e seconda linea e il condizionamento sono stati classificati in base al rischio di amenorrea permanente dopo il trattamento, come riportato nelle linee guida AIOM 2020 (31). In particolare, sono stati considerati:

- trattamenti ad alto rischio: classe 1
- trattamenti a rischio intermedio: classe 2
- trattamenti a rischio basso: classe 3
- trattamenti a rischio molto basso: classe 4
- trattamenti a rischio sconosciuto: classe 5.

La suddivisione specifica è riportata nella tabella sottostante (*Tabella II*), che ricalca quella delle linee guida AIOM.

GRADO DEL RISCHIO	CLASSE DI RISCHIO	TRATTAMENTO
Rischio elevato (>80%)	1	<ul style="list-style-type: none"> ○ Trapianto di cellule staminali ematopoietiche con ciclofosfamide/irradiazione corporea totale (TBI) o con ciclofosfamide/busulfano ○ Radioterapia a fasci esterni che comprenda come campo di irradiazione le ovaie ○ CMF, CAF, CEF, 6 cicli in una donna >40 anni
Rischio intermedio	2	<ul style="list-style-type: none"> ○ CMF, CAF, CEF, 6 cicli in una donna tra i 30 e i 39 anni ○ AC o EC 4 cicli in una donna >40 anni ○ AC o EC à taxani
Rischio basso (<20%)	3	<ul style="list-style-type: none"> ○ ABVD (doxorubicina/bleomicina/vinblastina/dacarbazina) ○ CHOP 4 o 6 cicli (ciclofosfamide/doxorubicina/vincristina/prednisone) ○ CVP (ciclofosfamide/vincristina/prednisone) ○ AML (antraciline/citarabina) ○ ALL (polichemioterapia) ○ CML, CAF, CEF 6 cicli in donna <30 anni ○ AC o EC 4 cicli in donna <40 anni
Rischio molto basso o assente	4	<ul style="list-style-type: none"> ○ Vincristina ○ Metotrexate ○ Fluoruracile
Rischio sconosciuto	5	<ul style="list-style-type: none"> ○ Oxaliplatino ○ Irinotecan ○ Anticopri monoclonali (trastuzumab, bevacizumab, cetuximab) ○ Inibitori tirosin-chinasi (imatinib, erlotinib)

Tabella II: classificazione delle terapie a seconda del rischio di amenorrea permanente (da Linee guida AIOM 2020)

Gli outcomes principali dello studio sono: la valutazione della funzionalità ovarica residua al follow up, mediante analisi della presenza del ciclo mestruale, della rilevazione di FSH, 17β -estradiolo e AMH compatibili con fisiologica attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio. Al contrario sono stati valutati anche i danni che in particolare la terapia di condizionamento per il trapianto di midollo hanno avuto sullo stesso asse, soffermandosi in particolare sulla riserva ovarica, sulla fertilità residua e sulla probabilità di insorgenza di gravidanza.

Gli end point primari sono:

- Valutazione della comparsa del menarca spontaneo o la persistenza dell'amenorrea dopo il trattamento di condizionamento per il trapianto di midollo
- Valutazione della presenza di cicli regolari nel momento dello studio
- Valutazione della necessità di somministrare terapie ormonali per indurre il menarca
- Valutazione dei valori ormonali di FSH, 17β -estradiolo e AMH plasmatici sia nella fase pre trattamento che nel post trattamento
- Valutazione dell'utilizzo di terapia di preservazione della fertilità prima di sottoporre le pazienti alla terapia di condizionamento
- Valutazione dell'insorgenza di gravidanze, sia spontanee che insorte in seguito a trattamenti di PMA.

L'analisi statistica è stata realizzata utilizzando il programma SPSS (versione 22, SPSS Inc, Chicago, IL). Le variabili continue sono state riportate come media +/- deviazione standard (DS). Le variabili assolute sono state riportate come frequenze (assolute) e percentuali (%). I confronti tra variabili continue non normalmente distribuite sono stati effettuati utilizzando il Mann-Whitney *U* test. Un valore $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Inizialmente sono state individuate le 99 pazienti sottoposte ad allotrapianto di midollo osseo presso l'unità operativa complessa dell'Oncoematologia Pediatrica di Padova, tra il 9 Marzo 2011 e l'11 Agosto 2020. In seguito, per ottenere un campione più omogeneo, sono state escluse le pazienti decedute prima del compimento del dodicesimo anno di età, per un totale di 20 individui (20,2%). A questo punto il campione risultava costituito da 79 pazienti.

L'età media delle pazienti al momento della diagnosi è di 6,9 anni ($\pm 5,2$).

Le patologie ematologiche diagnosticate sono così distribuite (*figura 1*): 10 casi di drepanocitosi (12,7%), 15 casi di leucemia mieloide acuta (19%), 25 casi di leucemia linfoblastica acuta (31,6%), 6 casi di anemia aplastica severa (7,6%).

Malattie meno frequentemente diagnosticate sono la leucemia mieloide cronica, l'anemia di Fanconi, l'anemia Blackfan-Diamond, la sindrome di Schwachman-Diamond e l'immunodeficienza combinata grave (SCID).

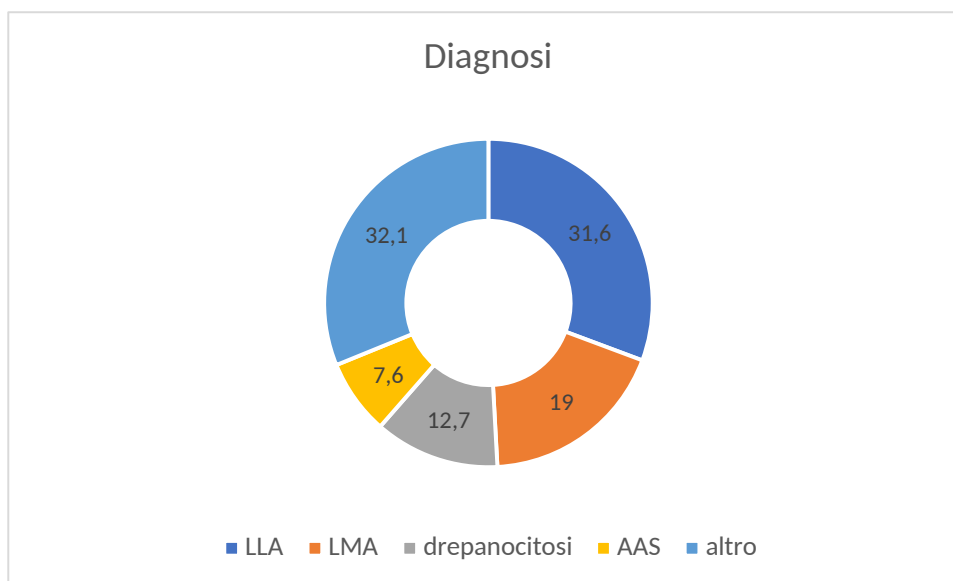


Figura 1: distribuzione delle diagnosi nella popolazione

L'età media al momento del trapianto di midollo è di 9,6 anni ($\pm 5,8$).

Per quanto riguarda il rischio gonadotossico dei trattamenti, si è tenuta in considerazione la classificazione AIOM 2020. (31) Secondo questa suddivisione 78 pazienti su 79, corrispondente al 98,7%, sono state sottoposte a terapia per il condizionamento considerata a rischio gonadotossico elevato. 29 pazienti su 79, corrispondenti al 36,7% del totale, sono state sottoposte a radioterapia in aggiunta alla chemioterapia; la terapia radiante è stata eseguita come TBI (total body irradiation). Due pazienti tra quelle che hanno ricevuto la TBI (2,5%) sono anche

state sottoposte a boost a livello del SNC. La dose media di radioterapia somministrata è di 12 Gy totali, somministrati solitamente in 6 frazioni. Al momento dello studio 11 pazienti, corrispondenti al 13,9%, sono decedute; l'età media al momento del decesso è di 17 anni ($\pm 3,4$).

Valori ormonali

- **pre trattamento**

Il valore di FSH dosato prima del trattamento è stato riportato il 29 pazienti su 79 (36,7%). In queste pazienti la media del FSH pre trattamento è di 8,8 U/l ($\pm 27,2$). Tra le 29 pazienti, 21 (72,4%) hanno un FSH pre trattamento minore di 5 U/l, 7 (24,1%) hanno un FSH compreso tra 5 e 30 U/l e solamente una paziente (corrispondente al 3,4%) ha il valore dell'FSH pre trattamento superiore a 30 U/l. (Figura 2)

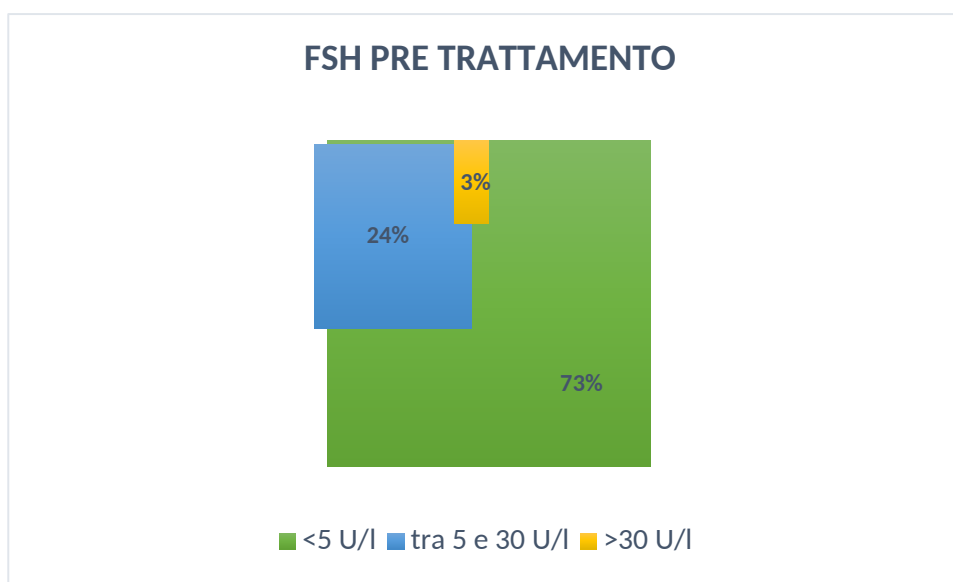


Figura 2: valore di FSH pre-trattamento

IL 17 β -estradiolo dosato in tutte le pazienti è stato riscontrato minore di 250 pmol/l.

L'AMH pre trattamento è stato valutato solamente in tre pazienti (3,8%); tra questi casi, uno è risultato indosabile.

- **post trattamento**

Il valore di FSH dopo il trattamento è stato dosato il 46 pazienti su 79 (58,2%). La media del valore di FSH nelle 46 pazienti è 54,3 U/l ($\pm 51,0$). Di queste 46 pazienti, 8 avevano un valore di FSH post trattamento minore 5 U/l

(pari al 17,4%), 14 tra 5 e 30 U/l (30,4%) e 24 pazienti avevano un valore di FSH maggiore di 30 U/l (52,2%). (Figura 3)

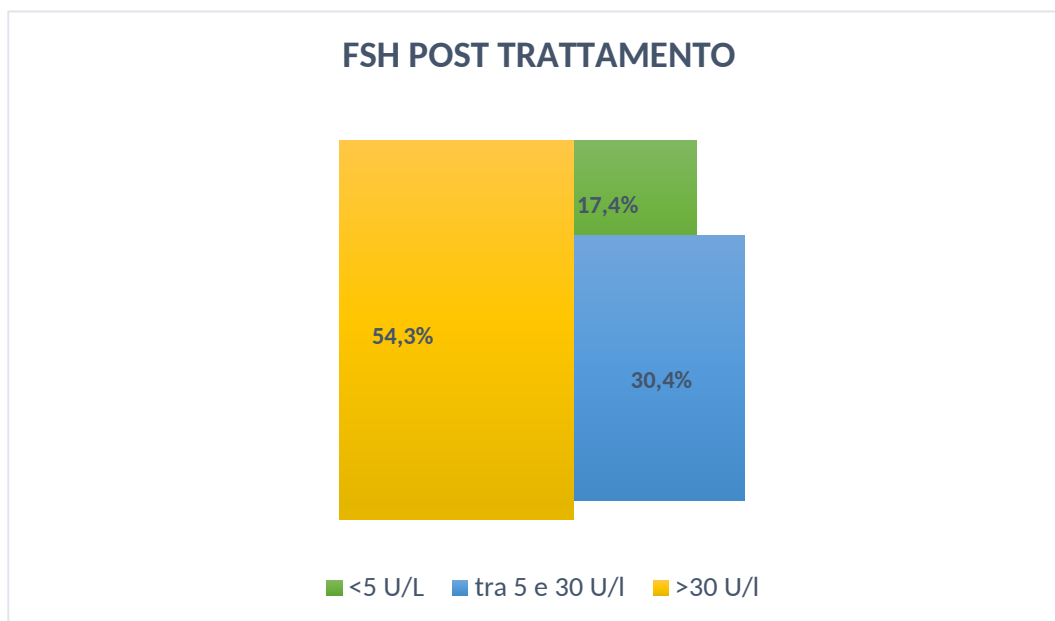


Figura 3: valori FSH post-trattamento

Il dosaggio del 17 β -estradiolo dopo il trapianto di midollo, come per FSH, è stato eseguito in 46 pazienti su 79 (58,2%). In tutti i casi è stato riscontrato un valore minore di 250 pmol/l.

Il valore di AMH è stato riportato in 5 casi su 79 pazienti dello studio (6,3 %). Il valore medio è 0,01 pmol/l.

Radioterapia e valori ormonali

Tra le 79 pazienti che sono state sottoposte a trapianto di midollo, e quindi a condizionamento chemioterapico, 29 (36,7 %) hanno ricevuto anche terapia radiante total body (TBI). In questo sottogruppo 2 pazienti sono state sottoposte a boost SNC dopo la TBI. Il dosaggio di FSH prima del trattamento è stato eseguito in 13 pazienti su 29 totali (44,8 %). La media del valore di FSH pre trattamento è 15,2 U/l (\pm 40,3) (Figura 4). In particolare, prima del trattamento 9 pazienti su 13 (69,2%) avevano valori di FSH minori di 5 U/l, 3 pazienti (23,1%) tra 5 e 30 U/l e solo 1 maggiore di 30 U/l (7,7%).

Dopo il trattamento, il valore di FSH è stato valutato in 20 pazienti (70%). Il valore medio di FSH post trattamento è 68,2 U/l (\pm 51,7) (Figura 4). Nello

specifico solo in 2 pazienti (10%) dopo il trattamento è stato riscontrato un valore di FSH minore di 5 U/l, in 2 (10%) tra 5 e 30 U/l, e in 16 maggiore di 30 U/l (80%).

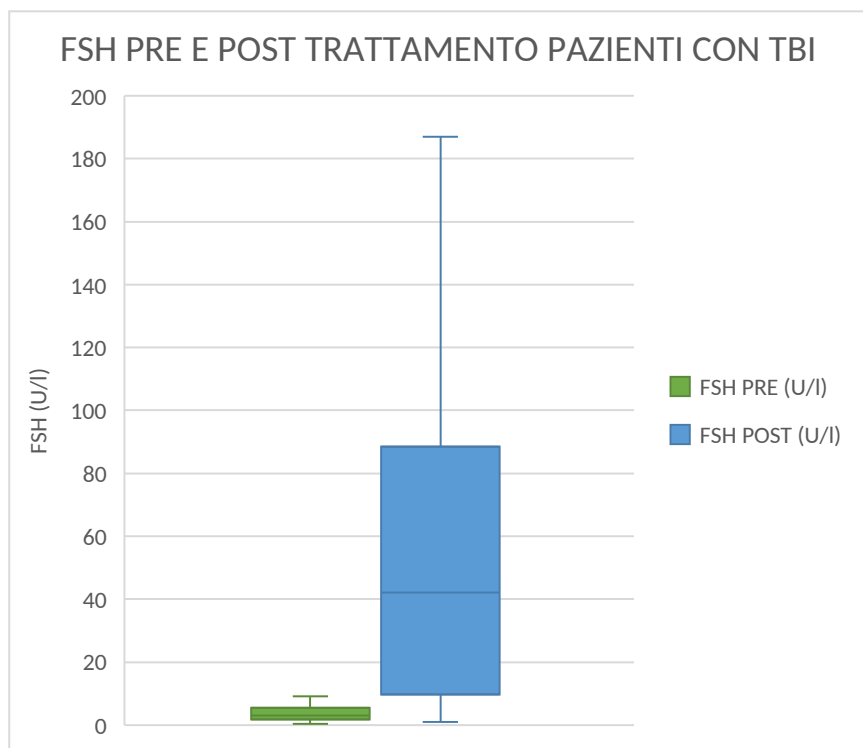


Figura 4: valori di FSH pre e post trattamento in pazienti trattati con TBI

Sempre in questo sottogruppo di pazienti, ossia quelli sottoposti a radioterapia total body, il valore di E2 prima del trattamento è stato valutato in 13 pazienti (44,8%). Nel post trattamento, invece E2 è stato dosato in 20 pazienti (70%). In entrambi i dosaggi i valori di E2 erano tutti al di sotto di 250 pmol/l.

Le pazienti che non sono state sottoposte a radioterapia (TBI) sono 50, sul totale di 79 pazienti incluse nello studio (63,3%). In questo sottogruppo abbiamo i dati relativi al valore di FSH prima del trattamento di 16 pazienti (32%). La media di questi valori è 3,5 U/l ($\pm 3,1$) (Figura 5). Prima del trattamento FSH era minore di 5 U/l in 12 pazienti (75%), tra 5 e 30 U/l in 4 pazienti (25%), e in nessun caso era maggiore di 30 U/l.

Nel dosaggio post trattamento invece, abbiamo dati riguardanti FSH in 26 pazienti (52%) sulle 50 facenti parte del sottogruppo che non ha ricevuto TBI. In questo caso la media post trattamento è 45,3 U/l ($\pm 44,2$) (Figura 5). In particolare, FSH

era minore di 5 U/l in 6 pazienti (23,1%), tra 5 e 30 in 11 pazienti (42,3%) e maggiore di 30 in 9 casi su 26 (34,6%).

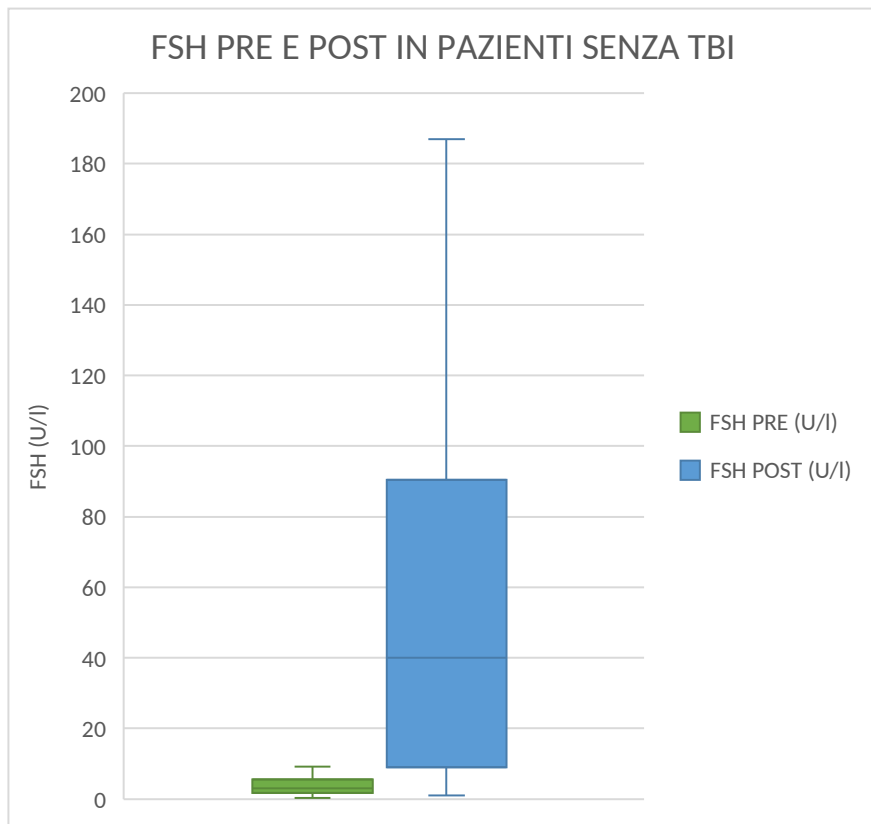


Figura 5: valori di FSH pre e post trattamento in pazienti non sottoposti a TBI

Nelle pazienti in cui è stato valutato FSH prima e dopo il trattamento, è possibile ottenere il Δ FSH, ossia la differenza tra FSH post trattamento e FSH pre trattamento. (Tabelle III e IV e Figura 6) La media dei Δ FSH è rispettivamente 84,8 U/l ($\pm 60,4$) nel caso dei pazienti sottoposti a TBI e 36,3 U/l ($\pm 40,7$) nei pazienti non sottoposti a radiazioni.

PAZIENTI CON TBI		
FSH pre (U/l)	FSH post (U/l)	Δ FSH (U/l)
5,9	52,2	46,3
0,3	2,3	2,0
4,5	10,5	6,0
3,1	186,9	183,3
8,7	127,0	118,3
8,5	161,1	152,6
4,6	133,9	129,3
3,1	99,7	96,6
9,2	127,6	118,4
2,5	86,3	83,8
2,9	5,2	2,3
2,2	80,4	78,2

Tabella III: Delta FSH in pazienti con TBI

PAZIENTI SENZA TBI		
FSH pre (U/l)	FSH post (U/l)	Δ FSH (U/l)
1,6	7,5	5,9
0,7	2,0	1,3
7,0	2,2	-4,8
1,9	5,2	3,3
4,9	25,0	20,1
3,4	107,2	103,8
2,3	104,0	101,7
1,4	40,0	38,6
4	44,4	40,4
5,1	85,4	80,3
0,6	2,3	1,7
3,3	79,4	76,1
1,1	4,5	3,4

Tabella IV: Delta FSH in pazienti senza TBI

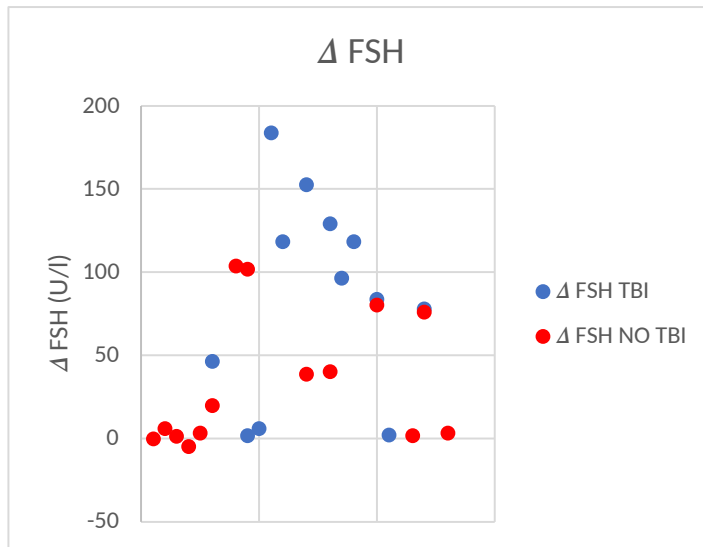


Figura 6: Distribuzione del delta FSH in pazienti con e senza TBI

Per quanto riguarda i valori di E2 prima del trattamento nel sottogruppo di pazienti non sottoposti a TBI, sono riportati i dati riguardanti 16 pazienti su 50 totali (32%). Sia prima che dopo il trattamento i valori di E2 erano sempre inferiori a 250 pmol/l.

Funzionalità ovarica

La funzionalità ovarica, oltre che per mezzo della valutazione dei livelli ormonali, può essere monitorata attraverso la comparsa del menarca, la regolarità dei cicli mestruali e la necessità di somministrazione di terapia ormonale. Si riscontrano informazioni sulla comparsa del menarca in 56 pazienti su 79 (70,9%); in questo sottogruppo la comparsa del menarca al momento dello studio è documentata in 30 pazienti (53,6%), 26 invece al momento dello studio non hanno ancora avuto il menarca (46,4%). A 4 delle pazienti con menarca comparso dopo il trattamento, questo è stato indotto farmacologicamente (13,3%), 17 lo hanno avuto spontaneamente (56,7%) e per le restanti 9 non si hanno dati a riguardo (30%) (Figura 7).

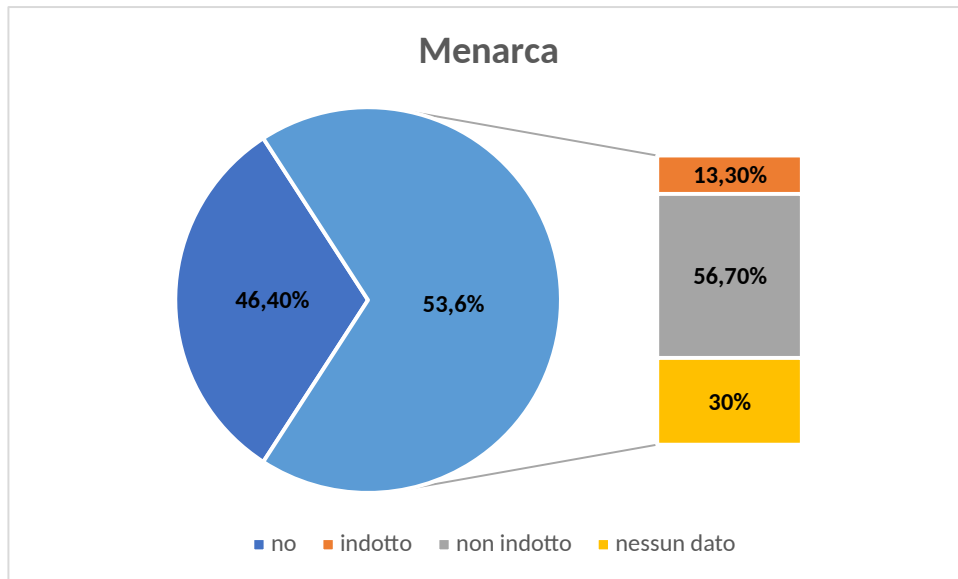


Figura 7: Dati relativi al menarca e alla modalità di insorgenza

Dati relativi alla regolarità del ciclo mestruale sono reperibili per 16 pazienti su 79 (20,3%). Tra queste 16 pazienti, 13 (81,3%) hanno avuto periodi di amenorrea dopo il trattamento. Due delle pazienti con storia di amenorrea hanno avuto il menarca indotto (15,4%), mentre negli altri 11 casi il menarca è stato spontaneo (84,6%).

23 delle 79 pazienti, il 29,1 %, sono ora in trattamento con terapia ormonale, nella maggior parte dei casi somministrato mediante cerotto transdermico; nel tempo viene poi cambiato metodo di somministrazione, con assunzione di pillola estroprogestinica per via orale.

Tutte e 4 le pazienti a cui è stato indotto il menarca farmacologicamente al momento dello studio assumono la terapia ormonale. 9 delle 13 pazienti che hanno manifestato periodi di amenorrea sono ora in trattamento con terapia ormonale (69,2%).

In accordo con le linee guida ESHRE, è stata posta diagnosi di POI (insufficienza ovarica precoce) in 9 pazienti su 79 totali, corrispondenti al 11,4%. Secondo le linee guida la diagnosi di POI va posta in caso di amenorrea o oligomenorrea per 4 mesi e valore del FSH, in almeno due punti a distanza di 4 settimane, maggiore di 25 U/l. (60) Tuttavia, un valore di FSH sopra i 25 U/l in pazienti giovani può

essere da solo considerato indicativo di POI; in questo caso le pazienti con POI sarebbero 24 (30,4%).

Radioterapia e funzionalità ovarica

Per quanto riguarda il sottogruppo delle 29 pazienti sottoposte a radioterapia durante il condizionamento, 11 di queste al momento dello studio hanno già avuto il menarca (37,9%), 8 non lo hanno ancora avuto (27,6%), e per le restanti 10 non sono state reperite informazioni (34,5%). Tra le 11 pazienti che hanno avuto il menarca, solo in 1 caso è stato indotto farmacologicamente. Nel gruppo delle 50 pazienti nel cui condizionamento non era prevista la radioterapia, 19 (38%) pazienti hanno avuto il menarca, 18 non lo hanno ancora avuto (36%) e per 13 pazienti non ci sono dati disponibili (26%).

La presenza di periodi di amenorrea in pazienti trattate con terapia radiante è testimoniata in 5 casi (17,2%), mentre negli altri 24 casi non sono stati riportati dati a riguardo (82,8%). Nel sottogruppo di pazienti non radiotrattate su 50 pazienti 8 hanno avuto periodi di assenza del ciclo mestruale (16%); negli altri 42 casi non ci sono informazioni a proposito.

15 pazienti su 29 radiotrattate (51,7%) hanno assunto terapia ormonale, mentre nel gruppo delle 50 non sottoposte a radioterapia solo 8 l'hanno assunta (16%).

Preservazione della fertilità

È emerso che delle 79 pazienti incluse nello studio, 8 (10,1%) hanno eseguito procedure per la preservazione della fertilità. Per tutte le pazienti è stata utilizzata la tecnica di crioconservazione del tessuto ovarico.

Insorgenza di gravidanze

Tra le pazienti incluse nello studio si è verificata una gravidanza. La paziente si era sottoposta alla preservazione della fertilità mediante crioconservazione di tessuto ovarico prima della terapia condizionante per il trapianto di midollo. La paziente in questione ha avuto un condizionamento privo di radioterapia, un menarca spontaneo, nessun periodo di amenorrea o trattamento ormonale dopo il

trapianto di midollo. Il valore dell'FSH era alto subito dopo il trattamento (101,9 U/l), ma poi è sceso fino ad arrivare ad un valore di normalità per l'età.

L'estradiolo ha avuto andamento opposto, era molto basso alla prima valutazione (18 pmol/l), ma è poi aumentato al diminuire del FSH.

DISCUSSIONE

Nel campo delle malattie ematologiche, sia maligne che non maligne, ci sono stati negli anni dei notevoli progressi per quanto riguarda la sopravvivenza del paziente. Un fattore che si fatica ancora a limitare è il danno che la chemioterapia e alcuni trattamenti, come il condizionamento per il trapianto di cellule staminali, hanno sulla fertilità, in particolare per quello che riguarda la fertilità femminile. (61) Proprio per questo motivo ASCO (American Society of Clinical Oncology) raccomanda che prima di questi trattamenti venga proposto al paziente di intraprendere, o almeno valutare, un counseling con specialisti della fertilità al fine di conoscere a tutto tondo quali siano le possibili conseguenze delle terapie gonadotossiche alle quali sarà sottoposto e quali sono le possibilità di preservazione della fertilità. (62) Nelle linee guida redatte da ASCO viene posta particolare attenzione alla popolazione pediatrica. Il paziente pediatrico, e i genitori in maniera particolare, vedono il fattore fertilità come un problema ancora molto distante nella vita del figlio, per tanto possono trovare difficoltà nel prendere decisioni, soprattutto nel momento in cui il proprio figlio ha una patologia maligna e dovrà affrontare molti trattamenti. (63) Per questo necessitano di figure di supporto e di percorsi di accesso al counseling per la fertilità ben determinati, al fine di orientarli al meglio nelle decisioni che dovranno prendere, che si ripercuoteranno in maniera importante sulla qualità della vita futura del figlio. (63) In relazione alla qualità della vita del paziente, va tenuta in considerazione non solo la possibilità di gravidanza, ma anche le conseguenze della POI (insufficienza ovarica precoce) a livello sistemico. Questa anticipa le problematiche che compaiono nella donna dopo la menopausa fisiologica, dovute al calo del livello degli estrogeni; tra queste troviamo le vampate (sintomi vasomotori che hanno implicazioni anche psicologiche), implicazioni neuro-fisiologiche come un declino della memoria a breve termine e delle funzioni cognitive, sintomi uro-genitali (atrofia, secchezza vaginale), patologie correlate al sistema cardiovascolare (dislipidemia, sindrome metabolica, disfunzione endoteliale, ipertensione), osteoporosi, diabete di tipo 2. (64)

Il livello di FSH sierico può essere considerato misura indiretta della funzionalità ovarica. (65) Nel nostro campione abbiamo individuato due gruppi di pazienti: il

gruppo sottoposto a radioterapia in aggiunta alla chemioterapia per il condizionamento, e il gruppo in cui è stata fatta solo chemioterapia di condizionamento. Nel gruppo sottoposto anche a terapia radiante la media di FSH dopo il trattamento è 68,2 U/l (\pm 51,7), mentre nell'altro gruppo è 45,3 U/l (\pm 44,2). Si nota un valore di FSH sensibilmente più elevato dopo il condizionamento che includeva TBI. Questi dati sono comparabili a quelli ottenuti da alcuni studi, come quello dell'Università del Minnesota (66), mentre si discosta parzialmente da uno studio francese, dove non si nota un aumento così importante di FSH. (67) Il gruppo che ha ricevuto TBI, dunque, ha valori medi di FSH post trattamento più elevati rispetto al gruppo che non ha ricevuto terapia radiante come già riportato; inoltre, anche la media del Δ FSH (FSH post trattamento – FSH pre trattamento) del gruppo che ha ricevuto la radioterapia è maggiore rispetto all'altro gruppo, a conferma dell'aumento maggiore dell'FSH nei pazienti radiotrattati. Il Δ FSH medio nei pazienti sottoposti a TBI è 84,8 U/l (\pm 60,4), mentre per i pazienti non sottoposti a radiazioni è 36,3 U/l (\pm 40,7). Tuttavia, pur essendo la media di FSH e il Δ FSH maggiore nelle pazienti radiotrattate, i livelli di FSH sono talmente elevati in entrambi i gruppi da essere compatibili con una situazione di insufficienza ovarica prematura (POI). Infatti, le differenze tra i gruppi con TBI e senza, non sono significative (p value >0,05); questo vale anche per il dosaggio di FSH dopo TBI o meno.

Anche l'amenorrea può essere considerato un indice, seppur imperfetto, della fertilità della donna. Nel nostro campione la comparsa di amenorrea è stata riportata in 13 pazienti su 16 (81,3%); va però tenuto presente che dati relativi alla regolarità della mestruazione era riportata nel 20,3% delle pazienti facenti parte dello studio. La presenza di amenorrea nel campione di studio sembra riguardare più pazienti rispetto a quanto riportato in letteratura: uno studio, condotto su giovani donne sottoposte a trapianto di midollo, riporta comparsa di amenorrea nel 68,1% dei casi. (69) Comparando i casi di amenorrea nel gruppo dei pazienti con TBI a quelli del gruppo dei pazienti non trattati con radiazioni, possiamo considerare i due dati simili (17,2 % vs 16% rispetto al totale della popolazione). Questo è confermato dal fatto che in entrambi i gruppi i valori di FSH sono talmente alti da essere compatibili con POI. I nostri dati si riferiscono ad una popolazione molto giovane, ma uno studio già citato stima che sopra i 30 anni di

età nessuna paziente sottoposta a TBI torna ad avere una stabilità del ciclo mestruale. (68)

Va comunque tenuto in considerazione che giovani donne sottoposte a trattamenti gonadotossici, pur con cicli mestruali regolari e valori di FSH nella norma, potrebbero avere una funzionalità ovarica compromessa (in particolare in termini di riserva ovarica), e di conseguenza avere una fertilità significativamente ridotta rispetto a controlli sani di pari età. (70) Per questo risulta importante offrire alle pazienti trattamenti per la preservazione della fertilità in vista della possibilità di procreare in futuro, seppure non prossimo. Inoltre, i nostri dati testimoniano la comparsa di POI dopo il trattamento nell'11,4% delle pazienti, che pur essendo una percentuale non molto alta va comunque considerata, in particolare in relazione alle conseguenze che la POI ha sulla qualità della vita della paziente. Considerando le pazienti da un punto di vista puramente clinico, la percentuale di quelle con POI è estendibile al 30,4%, cioè al totale della pazienti aventi FSH maggiore di 25 U/l. Queste percentuali sono più contenute rispetto a risultati ottenuti in altri studi, dove la percentuale di pazienti con POI arrivava al 64,7% e al 56%. (67)(71) La discrepanza tra i nostri dati e quelli della letteratura può essere spiegata dall'incompletezza dei dati a nostra disposizione (sia in relazione a periodi di amenorrea che a dosaggio di FSH). Per quanto riguarda la terapia ormonale, nel nostro studio è riportata l'assunzione di terapia ormonale da parte di 23 pazienti, corrispondenti al 29,1% dei casi. Questo dato risulta essere più basso rispetto a studi presenti in letteratura, dove la percentuale di pazienti che hanno avuto necessità di terapia ormonale è rispettivamente del 51,1% e del 44%. (72) (71) Le pazienti pre-puberi al momento del trapianto coinvolte nello studio sono 26, ossia il 46,4% delle pazienti di cui si hanno notizie riguardanti il menarca. Di queste 26 pazienti, 17, corrispondente al 56,7%, hanno avuto il menarca spontaneamente dopo i trattamenti gonadotossici. La frazione di pazienti prepuberi ottenuta dai nostri dati, che dopo il trapianto di midollo ha spontaneamente il menarca è del tutto sovrapponibile a quella ottenuta da un altro studio, nel quale questa percentuale era del 56%. (73) Sempre in questo studio (73) si evince che il 44% delle pazienti hanno avuto bisogno di indurre il menarca farmacologicamente; dai nostri dati invece, questa percentuale scende al 13,3%. Tra le pazienti con menarca spontaneo del nostro studio, 11 sono andate incontro

ad amenorrea in un secondo momento; questo è dovuto al fatto che in questi casi, dopo il trapianto di midollo, c'è una normalizzazione della funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi, che porta alla comparsa del ciclo mestruale, ma nel 68,9% dei casi, a causa delle terapie gonadotossiche che causano riduzione della riserva ovarica, non c'è stabilità sufficiente a permettere la comparsa di un ciclo mestruale regolare. In letteratura, tuttavia, sono riportati casi di gravidanze ottenute anche spontaneamente dopo la comparsa di ciclo mestruale dopo un periodo di amenorrea. (74) Questo significa che la ripresa del ciclo mestruale può essere il momento opportuno per la ricerca della gravidanza non solo mediante tecniche di PMA, ma anche spontaneamente. Al contrario, alcuni studi dimostrano come ci siano casi di infertilità e menopausa precoce anche in pazienti che dopo i trattamenti gonadotossici, in particolare il condizionamento che precede il trapianto di midollo, tornano ad avere cicli regolari. (68)

Una sola paziente ha avuto una gravidanza nel corso del follow up. La gravidanza è insorta spontaneamente nonostante la crioconservazione di tessuto ovarico che era stata effettuata prima del trattamento. I dati riguardanti le gravidanze sono comunque limitati, a causa della giovane età delle pazienti coinvolte nello studio (l'età media è di circa 16 anni).

La preservazione della fertilità è stata eseguita solo nel 10,1% delle pazienti; tutte queste hanno eseguito la crioconservazione del tessuto ovarico. Questa percentuale è inferiore a quella riportata in letteratura, che risulta essere del 29%; pur essendo più alta di quella relativa al nostro studio è una frazione ancora molto esigua rispetto al totale. (75)

Per quanto riguarda le tecniche da adottare per la preservazione della fertilità, in letteratura c'è comune accordo nel preferire la crioconservazione di tessuto ovarico alle altre tecniche utilizzabili per le pazienti pre-pubere. Questa tecnica è eseguibile anche in pazienti post pubere che non possano assumere terapia ormonale e che non possano rimandare l'inizio della chemioterapia di circa due settimane, tempo necessario per la stimolazione ovarica, che permette di eseguire la crioconservazione di ovociti maturi. (76) Quest'ultima tecnica è da preferire qualora vi sia il tempo per la stimolazione, in quanto considerata "standard of care" dall' American Society for Reproductive Medicine dal 2012. (77) Va considerato che per le pazienti sottoposte a trapianto di cellule staminali

emopoietiche, c'è il rischio reimpianto di cellule magline al momento del reimpianto del tessuto ovarico. Questo rischio è tanto più alto quanto maggiore è la probabilità che la malattia diagnosticata al paziente dia metastasi a livello ovarico: in particolare, le leucemie e il linfoma di Burkitt sono considerate a rischio alto (>10%), il linfoma non Hodgkin a rischio moderato (2-10%) e il linfoma di Hodgkin a rischio basso (<2%). (78) Questo rischio potrà essere eliminato utilizzando nuove tecniche come “artificial ovary” e l'utilizzo di tecniche in vitro per lo sviluppo di follicoli primordiali. (79)

Emerge quindi la necessità che il paziente pediatrico sottoposto a terapia gonadotossiche, in particolare al condizionamento per il trapianto di midollo, sia seguito non solo per quanto concerne la malattia di base, ma anche per quanto riguarda lo sviluppo puberale e la fertilità. Questo generalmente viene fatto da un ginecologo esperto di fertilità e di endocrinologia.

Il nostro studio presenta dei limiti, dati innanzitutto dalla giovane età delle pazienti al momento dello studio (l'età media è di circa 16 anni); questo comporta una valutazione solo parziale della fertilità e un'analisi molto limitata dell'insorgenza delle gravidanze. Un altro limite è la ridotta numerosità del campione, in particolare dei sottogruppi che hanno eseguito dosaggi di FSH, 17 β -estradiolo e ormone anti mulleriano (AMH) sia pre che post terapia. Questo vuole sottolineare l'importanza del fatto che il dosaggio ormonale sia prima della terapia che nei follow up dopo il trattamento, debba diventare parte della routine clinica.

COLCLUSIONI

L'insorgenza di una malattia ematologica in un paziente pediatrico è sicuramente un evento destabilizzante per i genitori, che si trovano in questa situazione cercando di prendere le decisioni migliori per la vita del proprio figlio. Spesso, in questo momento concitato, le decisioni che devono prendere i genitori e il paziente stesso, sono tempo-dipendenti, devono cioè essere fatte in un lasso di tempo molto breve. Per questo, fino a pochi anni fa, il counseling per la preservazione della fertilità non veniva sempre proposto ai genitori, perché veniva posto in secondo piano rispetto alla necessità di sottoporre il paziente alle cure. Veniva sottovalutata anche l'importanza della funzionalità ovarica e della fertilità futura del piccolo paziente (anche a causa della sua giovane età) di fronte al sensibile rischio per la sua sopravvivenza; questo avveniva anche a causa della scarsità di informazioni riguardanti la gonadotossicità dei trattamenti, e all'assenza di strumenti per valutare la riserva ovarica in particolare nel paziente pre-pubere. Oggi alcuni di questi aspetti dovrebbero essere stati chiariti, in particolare il problema della tempistica: infatti, grazie all'utilizzo di tecniche per la preservazione che non richiedano un tempo di preparazione della paziente, e possibile non ritardare di molto le cure. Oltre a ciò, per velocizzare il counseling vanno istituiti dei percorsi chiari di accesso a questo, coinvolgendo tutto il gruppo multidisciplinare che seguirà il giovane paziente, che comprenderà il pediatra, il ginecologo esperto di fertilità, delle figure di supporto psicologico sia per il paziente che per i genitori, ed eventualmente l'oncologo. Al genitore e ai pazienti vanno date tutte le informazioni perché possa fare una scelta consapevole, ponendo l'accento sulla sicurezza delle tecniche di preservazione, sull'efficacia nel dare gravidanze future, sull'invasività e sulle tempistiche necessarie.

BIBLIOGRAFIA

1. The childhood leukemia, Colby-Graham M.F., Chordas C., *Journal of Pediatric Nursing*, Vol 18, No 2 (April), 2003.
2. Stanulla M, Schrappe M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2009;46(1):52-63.
doi:10.1053/j.seminhematol.2008.09.007.
3. Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, et al. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol.* 2003;21(19):3616-3622.
4. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2004;350(15):1535-1548.
5. Seth R, Singh A. Leukemias in Children. *Indian J Pediatr.* 2015.
6. Core curriculum ematologia. G. Castoldi, V.Liso et al. 2014 (cap 6, pag 137).
7. Rubnitz JE, Look AT. Molecular genetics of childhood leukemias. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1998;20(1):1-11.
8. Elgarten CW, Aplenc R. Pediatric acute myeloid leukemia: updates on biology, risk stratification, and therapy. *Curr Opin Pediatr.* 2020.
9. McCarten KM, Nadel HR, Shulkin BL, Cho SY. Imaging for diagnosis, staging and response assessment of Hodgkin lymphoma and non-Hodgkin lymphoma. *Pediatr Radiol.* 2019.
10. Ablu O, Attarbaschi A. Non-Hodgkin's Lymphoma in Childhood and Adolescence. Springer International Publishing; 2019. Pag 15.
11. Allen CE, Kelly KM, Bollard CM. Pediatric lymphomas and histiocytic disorders of childhood. *Pediatr Clin North Am.* 2015.
12. Grufferman S, Delzell E. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Epidemiol Rev.* 1984;6:76-106.
13. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4:18010. Published 2018 Mar 15.
14. Vlachos A, Ball S, Dahl N, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol.* 2008;142(6):859-876.
15. Da Costa L, Leblanc T, Mohandas N. Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 2020.
16. Mamrak NE, Shimamura A, Howlett NG. Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. *Blood Rev.* 2017.
17. Kook H. Fanconi anemia: current management. *Hematology.* 2005;10 Suppl 1:108-110.
18. Mehta PA, Ebens C. Fanconi Anemia. 2002 Feb 14 [Updated 2021 Jun 3]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors.
19. Mehta PA, Davies SM, Leemhuis T, et al. Radiation-free, alternative-donor HCT for Fanconi anemia patients: results from a prospective multi-institutional study. *Blood.* 2017.
20. Hartung HD, Olson TS, Bessler M. Acquired aplastic anemia in children. *Pediatr Clin North Am.* 2013.
21. Brodsky RA, Jones RJ. Aplastic anaemia. *Lancet.* 2005;365(9471):1647-1656.

22. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:11. Published 2010 May 21.
23. Kattamis A, Forni GL, Aydinok Y, Viprakasit V. Changing patterns in the epidemiology of β -thalassemia. *Eur J Haematol.* 2020;105(6):692-703.
24. Khandros E, Kwiatkowski JL. Beta Thalassemia: Monitoring and New Treatment Approaches. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2019;33(3):339-353.
25. Goobie S, Popovic M, Morrison J, et al. Shwachman-Diamond syndrome with exocrine pancreatic dysfunction and bone marrow failure maps to the centromeric region of chromosome 7. *Am J Hum Genet.* 2001.
26. Farooqui SM, Ward R, Aziz M. Shwachman-Diamond Syndrome. In: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 25, 2021.
27. Pui CH, Gajjar AJ, Kane JR, Qaddoumi IA, Pappo AS. Challenging issues in pediatric oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(9):540–9.
28. Gibson BES, Wheatley K, Hann IM, Stevens RF, Webb D, Hills RK, De Graaf SSN, Harrison CJ. Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia* 2005;19:2130–2138.
29. Gerrard M, Cairo MS, Weston C, et al. Excellent survival following two courses of COPAD chemotherapy in children and adolescents with resected localized B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study. *Br J Haematol.* 2008.
30. Friedman D, Schwartz C, Hodgkin Lymphoma in *The Lymphoid Neoplasms*, 3rd edition, 2008.
31. Linee guida: preservazione della fertilità nei pazienti oncologici. *Aiom* 2020.
32. Meirow D, Biederman H, Anderson RA, Wallace WH. Toxicity of chemotherapy and radiation on female reproduction. *Clin Obstet Gynecol.* 2010 Dec;53(4):727-39.
33. Howell S, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998 Dec;27(4):927-43.
34. van der Kaaij MA, Heutte N, Meijnders P, et al. Premature ovarian failure and fertility in long-term survivors of Hodgkin's lymphoma: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Group and Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte Cohort Study. *J Clin Oncol.* 2012 Jan 20;30(3):291-9.
35. Meirow D, Dor J, Kaufman B, et al. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod.* 2007;2:1626–1633.
36. Sonigo C, Beau I, Binart N, Grynberg M. Anti-Müllerian Hormone in Fertility Preservation: Clinical and Therapeutic Applications. *Clin Med Insights Reprod Health.* 2019 Jun 14;13:1179558119854755.
37. National Cancer Institute consultabile a: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy> Consultato il 31/01/22.
38. Paix A, Antoni D, Waissi W, et al. Total body irradiation in allogeneic bone marrow transplantation conditioning regimens: A review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018.
39. Bunin, N., Aplenc, R., Kamani, N., Shaw, K., Cnaan, A., Simms, S., 2003. Randomized trial of busulfan vs total body irradiation containing conditioning regimens for children with acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study. *Bone Marrow Transplant* 32.
40. Wo, J.Y.; Viswanathan, A.N. Impact of Radiotherapy on Fertility,

- Pregnancy, and Neonatal Outcomes in Female Cancer Patients. *Int. J. Radiat. Oncol.* 2009, 73, 1304–1312.
41. Wallace W, Thomson A, Kelsey T. The radiosensitivity of the human oocyte. *Hum Reprod* 2003.
 42. Bath L., Critchley H., Chambers S, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WH. Ovarian and uterine characteristics after total body irradiation in childhood and adolescence: response to sex steroid replacement. *Br J Obstet Gynaecol* 1999.
 43. Critchley H, Wallace W, Shalet S. et al. Abdominal irradiation in childhood; the potential for pregnancy. *Br J Obstet Gynecol* 1992.
 44. Ogilvy-Stuart A., Shalet S. Effect of radiation on the human reproductive system. *Environ Health Perspect* 1993.
 45. Wallace W, Thomson A., Saran F, Kelsey TW. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005.
 46. Lanzkowsky P. *Manual of pediatric hematology and oncology*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press; 2011. Cap 29.
 47. Jadoul P, Donnez J. How does bone marrow transplantation affect ovarian function and fertility? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2012 Jun;24(3):164-71.
 48. Cancer Research Childhood cancer survival statistics. Consultabile a: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/childrens-cancers/survival> (visitato il 18/10).
 49. Gorman JR, Bailey S, Pierce JP, Su HI. How do you feel about fertility and parenthood? The voices of young female cancer survivors. *J Cancer Surviv.* 2012 Jun;6(2):200-9.
 50. Metzger ML, Meacham LR, Patterson B, Casillas JS, Constone LS, Hijiya N, Kenney LB, Leonard M, Lockart BA, Likes W, Green DM. Female reproductive health after childhood, adolescent, and young adult cancers: guidelines for the assessment and management of female reproductive complications. *J Clin Oncol.* 2013 Mar 20;31(9):1239-47.
 51. Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: Who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncol* 2005;6:209–218.
 52. Brougham MF, Crofton PM, Johnson EJ, Evans N, Anderson RA, Wallace WH. Anti-Müllerian hormone is a marker of gonadotoxicity in pre- and postpubertal girls treated for cancer: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jun;97(6):2059-67.
 53. Michalczyk K, Cymbaluk-Płoska A. Fertility Preservation and Long-Term Monitoring of Gonadotoxicity in Girls, Adolescents and Young Adults Undergoing Cancer Treatment. *Cancers (Basel).* 2021 Jan 8;13(2):202.
 54. Lee, S.J.; Schover, L.R.; Partridge, A.H.; Patrizio, P.; Wallace, W.H.; Hagerty, K.; Beck, L.N.; Brennan, L.V.; Oktay, K. American Society of Clinical Oncology Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24, 2917–2931.
 55. Shapira M, Dolmans MM, Silber S, Meirou D. Evaluation of ovarian tissue transplantation: results from three clinical centers. *Fertil Steril.* 2020 Aug;114(2):388-397.
 56. Gellert SE, Pors SE, Kristensen SG, Bay-Björn AM, Ernst E, Yding Andersen C. Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. *J Assist Reprod Genet.* 2018 Apr;35(4):561-570.

57. Meiorow, D.; Ra'Anani, H.; Shapira, M.; Brenghausen, M.; Chaim, S.D.; Aviel-Ronen, S.; Amariglio, N.; Schiff, E.; Orvieto, R.; Dor, J. Transplantations of frozen-thawed ovarian tissue demonstrate high reproductive performance and the need to revise restrictive criteria. *Fertil. Steril.* 2016, 106, 467–474.
58. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. In vitro maturation: A committee opinion. *Fertil. Steril.* 2013, 99, 663–666.
59. Salama, M.; Anazodo, A.; Woodruff, T.K. Preserving fertility in female patients with hematological malignancies: The key points. *Expert Rev. Hematol.* 2019, 12, 375–377.
60. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2016.
61. Ozdemir ZN, Bozdogan SC. Hematological Malignancies and Fertility. *Adv Exp Med Biol.* 2020.
62. Oktay K, Harvey BE, Partridge AH, et al. Fertility Preservation in Patients With Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2018;36(19):1994-2001.
63. Moravek MB, Appiah LC, Anazodo A, et al. Development of a Pediatric Fertility Preservation Program: A Report From the Pediatric Initiative Network of the Oncofertility Consortium. *J Adolesc Health.* 2019;64(5):563-573.
64. Ishizuka B. Current Understanding of the Etiology, Symptomatology, and Treatment Options in Premature Ovarian Insufficiency (POI). *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:626924. Published 2021 Feb 25.
65. Marci R, Mallozzi M, Di Benedetto L, et al. Radiations and female fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):112. Published 2018 Dec 16.
66. Mertens AC, Ramsay NK, Kouris S, Neglia JP. Patterns of gonadal dysfunction following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22(4):345-350.
67. Couto-Silva AC, Trivin C, Thibaud E, Esperou H, Michon J, Brauner R. Factors affecting gonadal function after bone marrow transplantation during childhood. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(1):67-75.
68. Chiodi S, Spinelli S, Bruzzi P, Anserini P, Di Grazia C, Bacigalupo A. Menstrual patterns, fertility and main pregnancy outcomes after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *J Obstet Gynaecol.* 2016;36(6):783-788.
69. Assouline E, Crocchiolo R, Prebet T, et al. Impact of reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation on women's fertility. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013;13(6):704-710.
70. Larsen EC, Müller J, Rechnitzer C, Schmiegelow K, Andersen AN. Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and basal FSH <10 IU/l. *Hum Reprod.* 2003;18(2):417-422.
71. Bresters D, Emons JA, Nuri N, et al. Ovarian insufficiency and pubertal development after hematopoietic stem cell transplantation in childhood. *Pediatr Blood Cancer.* 2014;61(11):2048-2053.
72. Borgmann-Staudt A, Rendtorff R, Reinmuth S, et al. Fertility after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in childhood and adolescence. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47(2):271-276.
73. Sarafoglou K, Boulad F, Gillio A, Sklar C. Gonadal function after bone marrow transplantation for acute leukemia during childhood. *J Pediatr.* 1997;130(2):210-216.

74. Salooja N, Szydlo RM, Socie G, et al. Pregnancy outcomes after peripheral blood or bone marrow transplantation: a retrospective survey. *Lancet*. 2001;358(9278):271-276.
75. Diesch T, Rovo A, von der Weid N, et al. Fertility preservation practices in pediatric and adolescent cancer patients undergoing HSCT in Europe: a population-based survey. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52(7):1022-1028.
76. Burns KC, Hoefgen H, Strine A, Dasgupta R. Fertility preservation options in pediatric and adolescent patients with cancer. *Cancer*. 2018;124(9):1867-1876.
77. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril*. 2013;99(1):37-43.
78. Dolmans MM, Donnez J, Cacciottola L. Fertility Preservation: The Challenge of Freezing and Transplanting Ovarian Tissue. *Trends Mol Med*. 2021;27(8):777-791.
79. Fisch B, Abir R. Female fertility preservation: past, present and future. *Reproduction*. 2018;156(1):F11-F27.