

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
Scienze Mediche Generali e dei Servizi**

**Ciclo XXIX**

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/H1 GINECOLOGIA E OSTETRICIA**

**Settore Scientifico disciplinare: MED40**

**TITOLO TESI**

**EFFETTO DEI CHEMIOTERAPICI E DEGLI  
ANTIOSSIDANTI SULLA PRESERVAZIONE DEL  
TESSUTO OVARICO CRIOCONSERVATO PRELEVATO  
DA PAZIENTI ONCOLOGICHE**

**Presentata da: Dott.ssa ROSSELLA VICENTI**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Luigi Bolondi**

**Relatore**

**Dott.ssa Raffaella Fabbri**

**Esame finale anno 2017**

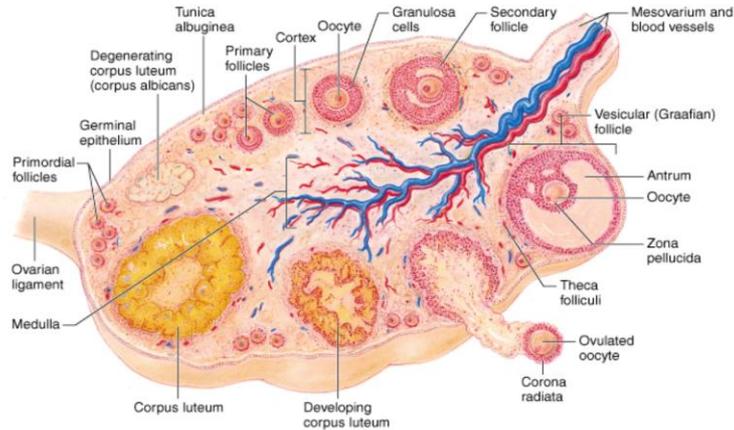
## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Gonadi femminili: le ovaia</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Terapia antitumorale e gonatotossicità</b>	<b>2</b>
1.2.1. Radioterapia	3
1.2.2. Chemioterapia	4
1.2.2.1. Doxorubicina	7
1.2.2.2. Cisplatino	10
<b>1.3. Preservare la funzione gonadica: Crioconservazione del tessuto ovarico</b>	<b>12</b>
1.3.1. Procedura di crioconservazione del tessuto ovarico	14
1.3.2. Impieghi del tessuto ovarico crioconservato	15
1.3.3. Effetti biologici della procedura di crioconservazione	17
1.3.4. Protezione dai danni da congelamento: Agenti antiossidanti	19
<b>1.4. Preservare la funzione gonadica: Protezione farmacologica</b>	<b>21</b>
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Prelievo del tessuto ovarico</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Protocollo di crioconservazione del tessuto ovarico: congelamento lento/scongelo rapido</b>	<b>24</b>
3.2.1. Congelamento lento	24
3.2.2. Scongelo rapido	25
<b>3.3. Valutazione dell'effetto antiossidante della NAC sul tessuto ovarico sottoposto alla procedura di crioconservazione</b>	<b>26</b>
3.3.1. Pazienti	26
3.2.2. Spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica (EPR)	26
3.3.3. Microscopia ottica	27
3.3.3.1. TUNEL Assay	28
3.3.3.2. Immunoistochimica	28
3.3.4. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	29
<b>3.4. Valutazione dell'effetto della NAC e dell'LH su tessuto ovarico trattato in vitro con doxorubicina (DOX) e cisplatino (CIS)</b>	<b>32</b>
3.4.1. Pazienti	32
3.4.2. Isolamento e coltura di cellule stromali da tessuto ovarico congelato/scongelo	32
3.4.3. Valutazione della purezza della coltura di cellule stromali	33
3.4.3.1. Immunofluorescenza indiretta	34

3.4.3.2. Reverse transcription-PCR (RT-PCR)	35
3.4.4. Trattamento delle cellule stromali ovariche con doxorubicina (DOX) e cisplatino (CIS)	38
3.4.4.1. Caratterizzazione morfologica delle cellule stromali	38
3.4.4.2. Valutazione della vitalità cellulare	39
3.4.4.3. Western blot	40
3.4.5. Trattamento delle cellule stromali ovariche con DOX/CIS e N-Acetilcisteina (NAC) / ormone luteinizzante (LH)	42
3.4.5.1. Real Time-PCR	42
<b>4. RISULTATI</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Valutazione dell'effetto antiossidante della NAC sul tessuto ovarico sottoposto alla procedura di crioconservazione</b>	<b>44</b>
4.1.1. Spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica (EPR)	44
4.1.2. Microscopia ottica: Istologia, TUNEL Assay e Immunoistochimica	45
4.1.3. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	47
<b>4.2 Valutazione dell'effetto della NAC e dell'LH su tessuto ovarico trattato in vitro con doxorubicina (DOX) e cisplatino (CIS)</b>	<b>49</b>
4.2.1. Caratterizzazione morfologica delle cellule stromali	49
4.2.2. Purezza della coltura di cellule stromali	49
4.2.3. Trattamento delle cellule stromali ovariche con doxorubicina (DOX) e cisplatino (CIS)	53
4.2.3.1. Saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD	53
4.2.3.2. Saggio della sulforodamina B (SRB)	57
4.2.3.3. Western blot	57
4.2.4. Effetto della NAC sui danni indotti da DOX e CIS sulle cellule in coltura	59
4.2.5. Effetto dell'LH sui danni indotti da DOX e CIS sulle cellule in coltura	60
<b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	<b>63</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>70</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Gonadi femminili: le ovaia



*Fig 1. Struttura dell'ovaio e maturazione follicolare*

Le ovaia (*Fig 1*) sono organi pari con funzione gametogenica, in quanto producono le cellule germinali femminili, ed endocrina, secernendo gli ormoni sessuali. Nella donna misurano circa 3 cm di lunghezza, 1,5 cm di larghezza e 1 cm di spessore, e sono localizzate nella cavità peritoneale ai lati dell'utero.

All'esame istologico, l'ovaio appare rivestito esternamente da un epitelio monostratificato costituito da cellule cubiche, detto epitelio germinativo; sotto di esso si trova uno strato di tessuto connettivo compatto, la falsa albuginea, che delimita il parenchima dell'organo.

Quest'ultimo è formato da una zona periferica o corticale, e da una centrale o midollare.

1. La CORTICALE ha uno spessore che può variare da 2 a 10 mm ed è caratterizzata dallo stroma corticale e dagli organuli ovarici.

Lo stroma corticale ovarico è costituito da fibre collagene e cellule stromali simili a fibroblasti posti a circondare gli organuli ovarici. Questo tessuto non è statico, ma va incontro a modificazioni morfologiche e funzionali a seconda delle diverse fasi del ciclo ovarico. Infatti, cellule stromali indifferenziate possono trasformarsi in elementi endocrini (cellule della teca) quando vengono in contatto con i follicoli in via di sviluppo.

Gli organuli ovarici sono follicoli ovarici a vari stadi maturativi, follicoli atresici e corpi lutei funzionanti e in regressione.

Al momento della nascita, nell'ovaio sono presenti circa 1-2 milioni di follicoli, ma a causa di continui processi di atresia questa riserva si riduce progressivamente nel tempo. Al momento della pubertà, infatti, solo 400.000 follicoli sono presenti in entrambe le ovaie; di questi soltanto 300-400 verranno ovulati durante la vita fertile, mentre gli altri andranno incontro ad atresia. L'esaurimento della riserva ovocitaria occorre all'incirca verso i 50 anni e determina la fine del periodo fertile e l'ingresso della donna in menopausa (Broekmans *et al.* 2007).

I follicoli ovarici sono costituiti da un ovocita circondato da cellule follicolari o cellule della granulosa. Al momento della nascita nelle ovaie della neonata sono presenti solo follicoli primordiali, follicoli formati da un ovocita primario circondato da uno strato di 5-6 cellule della granulosa. Quest'ultime, in seguito, si trasformano in grosse cellule cuboidali che poi proliferano organizzandosi in più strati intorno alla cellula germinale, formando così il follicolo primario multilaminare. Questo viene successivamente circondato da cellule stromali, le cellule della teca, le quali si dispongono a formare lo strato della teca interna e della teca esterna. La struttura costituitasi, è denominata follicolo secondario o preantrale.

2. La MIDOLLARE si trova in profondità e giunge in periferia solo a livello dell'ilo. Ha un aspetto spugnoso e di colore rossastro essendo costituita da tessuto connettivo lasso in cui decorrono numerosi vasi e nervi. Tali strutture vascolari, sia sanguigne sia linfatiche, penetrano nell'ovaio attraverso l'ilo ovarico e si dirigono, con decorso elicoidale, verso la corticale ovarica. In prossimità dell'ilo si trovano, inoltre, dei gruppi di cellule, le cellule ilari, aventi caratteristiche sia morfologiche sia funzionali simili alle cellule di Leyding del testicolo, con capacità androgenica.

A livello della sostanza midollare sono accolti anche i follicoli ovarici a stadi maturativi più avanzati, cioè i follicoli antrali e preovulatori.

## **1.2. Terapia antitumorale e gonadotossicità**

Secondo quanto stimato dall'Associazione Italiana Registri Tumori, una donna su tre ha probabilità di ammalarsi di cancro; in ogni caso, i continui progressi in ambito diagnostico e terapeutico, hanno migliorato notevolmente le aspettative di vita delle pazienti.

D'altro canto, i trattamenti antitumorali, sia chemioterapici sia radioterapici, possono causare molti effetti collaterali, tra cui dei seri danni a livello ovarico, portando ad una riduzione parziale o totale del potenziale riproduttivo della donna (Meirow *et al.* 2001).

I possibili meccanismi di danno, ad oggi conosciuti, includono apoptosi follicolare, fibrosi corticale ed atrofia ovarica. Essendo il numero di cellule germinali presenti nel tessuto ovarico determinato fin dall'età fetale, l'effetto citotossico della terapia antitumorale risulta essere irreversibile, a differenza di quanto invece si può osservare nei tessuti a rapido turn-over (come midollo osseo, tratto gastrointestinale).

La deplezione irreversibile del pool follicolare implica, a sua volta, la perdita della funzionalità steroidogenica dell'ovaio, con una conseguenziale riduzione della probabilità di comparsa di menarca nelle bambine prepuberi ed aumento della probabilità di fallimento ovarico precoce (POF) ed infertilità in donne adulte in età premenopausale (Schmidt *et al.* 2010).

### **1.2.1. Radioterapia**

La radioterapia è un particolare tipo di terapia usata per il trattamento di tumori che sfrutta radiazioni ionizzanti capaci di danneggiare il DNA delle cellule bersaglio. Le cellule tumorali, generalmente, non sono capaci di riparare i danni e vanno incontro a morte cellulare. Tuttavia, questo trattamento non colpisce solo cellule tumorali, ma anche cellule sane dei tessuti circostanti dando luogo a una serie di effetti collaterali.

La radioterapia, eseguita a livello pelvico o totale (total body), causa danni a livello delle ovaie determinando alterazioni del DNA ovocitario e follicolare, atrofia follicolare e riduzione della riserva ovarica follicolare. Di conseguenza si manifesta un'alterata produzione di ormoni e menopausa precoce.

Nondimeno, il grado di compromissione della funzionalità gonadica è dipendente dall'età della paziente al momento dell'esposizione alla radioterapia, dalla dose di radiazioni ricevuta e dall'estensione dell'area trattata.

Analisi matematiche, condotte da Wallace *et al.*, hanno stimato che la dose di radioterapia total body necessaria per distruggere il 50% di ovociti immaturi (LD50) è inferiore a 2 Gy (Wallace *et al.* 2003). Partendo da questo valore, Wallace *et al.* hanno ideato un modello matematico che permetta di predire l'età in cui si manifesterà la menopausa precoce nelle pazienti trattate con una certa dose di radioterapia. Si osserva in particolare

come l'ESD (dose effettiva sterilizzante), o dose di radioterapia frazionata, a cui appare il fallimento ovarico dopo il trattamento nel 97.5% delle pazienti, si riduca con l'età. Si stima che alla nascita l'ESD è di 20.3 Gy; a 10 anni è di 18.4 Gy; a 20 anni di 16.5 Gy; a 30 anni di 14.3 Gy; a 40 anni bastano 6 Gy (Wallace *et al.* 2005). Il fallimento ovarico precoce è dunque strettamente connesso all'età della paziente e al grado della riserva follicolare ovarica presente al momento della terapia.

Chiarelli *et al.* hanno dimostrato che il rischio di menopausa aumenta in maniera significativa all'aumentare della dose di radioterapia addomino-pelvica ricevuta. In particolare le pazienti che ricevono dosi minori di 20-35 Gy manifestano infertilità nel 22% dei casi, mentre dosi maggiori di 35 Gy la determinano nel 32% (Chiarelli *et al.* 1999).

Il danno ovarico può derivare anche dall'esposizione a radiazioni a livello del cranio (ad esempio trattamento di tumori cerebrali). Ciò, può causare disturbi all'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi con conseguente alterazione dell'ovulazione e della fertilità della donna (Littley *et al.* 1989; Constantine *et al.* 1993). Uno studio di Bath *et al.* ha analizzato 251 donne trattate con radioterapia a livello cranico, dopo 5 anni dal trattamento, osservando come dosi maggiori di 20 Gy portino ad una riduzione significativa della concentrazione delle gonadotropine nel sangue, ed in particolare dell'ormone luteinizzante, con conseguente accorciamento della fase luteinica (Bath *et al.* 2001).

### **1.2.2. Chemioterapia**

La chemioterapia sfrutta sostanze chimiche capaci di interferire con i meccanismi legati alla replicazione cellulare, impedendola (farmaci citostatici) o uccidendo le cellule durante questo processo (farmaci citotossici). Per cui, l'effetto della chemioterapia si realizza soprattutto sulle cellule tumorali che hanno crescita veloce, ma anche su alcuni tipi di cellule sane soggette a rapida replicazione. Proprio da ciò derivano i più comuni effetti collaterali a tale terapia.

Studi recenti hanno inoltre dimostrato che le cellule riproduttive sono molto sensibili a questi farmaci, anche se ancora in uno stato di quiescenza (ad esempio nelle giovani prepuberi). Questo può portare ad una riduzione della riserva ovarica e quindi infertilità e fallimento ovarico precoce. L'entità del danno subito è legato a molti fattori quali tipo di trattamento, dose del trattamento chemioterapico ed età della paziente al momento della terapia.

In base al grado di gonadotossicità i farmaci chemioterapici possono essere classificati in farmaci ad alto rischio, medio rischio e basso rischio come indicato in *Tabella 1* (Fleischer *et al.* 2011).

<b>HIGH RISK</b>	<b>MEDIUM RISK</b>	<b>LOW RISK</b>
ALKYLATING AGENTS: cyclophosphamide, ifosfamide, busulphan, chlorambucil, melphalan, chlormethine, procarbazine	PLATINUM AGENTS: cisplatin, carboplatin	VINCA ALKALOIDS: vincristine, vinblastine
	ANTHRACYCLIN ANTIBIOTICS: doxorubicin (adriamycin)	AMTIMETABOLITES: methotrexate, 5- fluorouracil, mercaptopurine
	TAXOIDS: paclitaxel, docetaxel	ANTHRACYCLIN ANTIBIOTICS: bleomycin

**Tabella 1.** *Rischio gonadotossico dei principali agenti chemioterapici*  
(Fleischer *et al.* 2011)

Oltretutto, spesso questi trattamenti sono combinati tra di loro per aumentarne l'effetto antitumorale e ridurre il rischio di farmaco-resistenza. Tuttavia aumentano anche gli effetti collaterali e quindi la gonadotossicità e il rischio di POF (Meirow *et al.* 2001; Fleischer *et al.* 2011; Blumenfeld *et al.* 2012).

Un altro importantissimo fattore che influenza il rischio nelle donne trattate di andare incontro ad amenorrea precoce, è l'età al momento della terapia. Meirow *et al.* analizzando 168 pazienti trattate con protocolli chemioterapici simili, hanno osservato come vi sia una incidenza maggiore di fallimento ovarico ed infertilità nelle donne con età maggiore (34.7 anni in media) rispetto a quelle più giovani (27 anni in media). Questo deriva dal fatto che nelle donne del primo gruppo, per via dell'età, il pool ovocitario al momento della terapia è minore rispetto a quello del secondo gruppo. Nelle donne più giovani, la perdita di follicoli a causa della terapia potrebbe non essere tale da determinare la comparsa di menopausa nell'immediato (Meirow 2000). È pur vero che, essendo comunque la riserva ovarica compromessa, in queste donne aumenta il rischio di menopausa precoce in momenti successivi (Wallace *et al.* 1993; Chiarelli *et al.* 1999).

Nel corso degli anni molti studi sono stati condotti per determinare da cosa derivi l'azione gonadotossica della terapia antitumorale.

Il meccanismo coinvolto nella perdita di follicoli primordiali non è ancora ben conosciuto. Studi sia *in vitro* su tessuto umano (Familiari *et al.* 1993) che *in vivo* su animale (Oktem *et al.* 2007) hanno documentato la presenza

di un elevato numero di follicoli primordiali apoptotici nei tessuti ovarici, dopo essere stati sottoposti a chemioterapia. Non è stato però attualmente valutato se fenomeni apoptotici si verificano anche in vivo nell'uomo.

Gli studi di Familiari et al. del 1993 hanno mostrato, inoltre, attraverso osservazioni al Microscopio Elettronico, un rigonfiamento citoplasmatico e nucleare in cellule della granulosa dei follicoli primordiali (Familiari *et al.* 1993).

Una recente ipotesi, avanzata da Philosoph-Kalich et al., spiega la deplezione follicolare attraverso il meccanismo *burn out*. Secondo tale ipotesi gli agenti chemioterapici eliminerebbero principalmente i follicoli in via di sviluppo; d'altra parte tale perdita spinge i follicoli primordiali ad accrescersi per sostituire i follicoli persi. Come risultato, si assiste ad una veloce deplezione del pool di follicoli primordiali (Philosoph-Kalich *et al.* 2009; Meiorow et al. 2010). Dati a favore di tale ipotesi sono stati ottenuti da Roti et al. analizzando le ovaie di topi sottoposti a doxorubicina. Secondo gli autori, follicoli di dimensioni maggiori (secondari, antrali precoci e antrali tardivi) vanno incontro ad apoptosi prima rispetto ai follicoli primordiali e primari. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che le cellule della granulosa dei follicoli in accrescimento sono in attiva mitosi (al contrario invece dei follicoli quiescenti), fenomeno che le rende più suscettibili al danno al DNA del chemioterapico. La deplezione di follicoli primordiali che si osserva nelle donne trattate con doxorubicina, sarebbe quindi legato al fenomeno di *burn out* (Roti *et al.* 2012)

Oktem et al. hanno analizzato la funzionalità delle cellule stromali in ovaie di pazienti sottoposte a chemioterapia. Le cellule stromali dell'ovaio rivestono, infatti, un ruolo molto importante nella funzione endocrina e nella riparazione di danni a livello ovarico. Usando come end-point surrogato la capacità dello stroma di produrre estradiolo, hanno osservato una significativa riduzione della funzionalità dello stroma. Inoltre questa riduzione non è connessa al tipo di regime terapeutico, indicando che il danno a livello stromale non è specifico di una determinata classe di chemioterapici (Oktem *et al.* 2007)

Attraverso analisi a Microscopio Ottico, Marcello et al. nel 1990 hanno dimostrato che la chemioterapia provoca fibrosi corticale ovarica e danni a livello dei vasi sanguigni (Marcello *et al.* 1990). Risultati simili sono stati ottenuti da studio più recente condotto da Meiorow et al nel 2007. Si è visto che nelle ovaie di donne esposte a chemioterapia, vi è un restringimento del lume dei vasi sanguigni ed una elevata attivazione di cellule progenitrici



riducendo il superavvolgimento; a questo punto la continuità del filamento viene ripristinata grazie all'azione di enzimi specifici. La doxorubicina, come anche le altre antracicline, blocca la topoisomerasi II a livello del sito di taglio del DNA stabilizzando il complesso ed impedendo così ai sistemi di riparazione di ripristinare l'integrità della doppia elica (Nitis 2009; Thornet *al.* 2011).

Un altro meccanismo coinvolto nella morte cellulare indotta da doxorubicina è legato alla sua capacità di generare radicali liberi. Il farmaco presenta una struttura chinonica (*Fig 2*) che può essere ossidata a semichinone per aggiunta di un elettrone (Berlin *et al.* 1981), una struttura capace di reagire velocemente con l'ossigeno generando anione superossido ( $O_2^-$ ) e perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Inoltre, la doxorubicina è un chelante del ferro (Myers 1998): il complesso doxorubicina-ferro può catalizzare la reazione di conversione del perossido d'idrogeno a radicale ossidrilico ( $\bullet OH$ ), altamente reattivo. Per cui, la doxorubicina ha la capacità di creare un alto grado di stress ossidativo intracellulare che a sua volta causa danni al DNA portando la cellula a morte.

Infine, Pang *et al.* hanno recentemente dimostrato un possibile ed ulteriore meccanismo di azione della doxorubicina. Secondo i loro studi, in seguito ad intercalazione del DNA, la molecola allontanerebbe gli istoni, tra cui l'istone H2AX, il quale svolge un ruolo fondamentale nel controllo dell'integrità del genoma cellulare (Pang *et al.* 2013).

Come tutti gli agenti chemioterapici, la doxorubicina agisce non solo sulle cellule tumorali ma anche su cellule normali.

Da tempo ne è stato dimostrato l'effetto gonadotossico, rientrando nella classe di antitumorali a rischio intermedio di fallimento ovarico. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, è utilizzata in combinazione con altri farmaci e dunque il rischio di sviluppare amenorrea rientra nel range 20-80% (ad esempio la terapia con doxorubicina e ciclofosfamide -AC - presenta un rischio intermedio mentre la terapia con doxorubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina -ABVD - un rischio molto basso, intorno al 20%).

È necessario sottolineare come il rischio sia anche strettamente connesso all'età della paziente: ad esempio nel caso della terapia con ciclofosfamide, doxorubicina e fluorouracile -CAF - risulta maggiore dell'80% se la paziente ha età maggiore di 40 anni; intermedio se ha età compresa tra 30 e 39 anni; inferiore al 20% se la paziente ha età inferiore a 30 anni (Lee *et al.* 2006).

Molti studi sono stati condotti per determinare quale sia l'azione della doxorubicina sull'ovaio.

Perez et al., nel 1997, hanno osservato che oociti di topo ovulati (quindi bloccati in meiosi II) esposti a doxorubicina presentano frammentazione dei cromosomi, attivazione delle caspasi mitocondriali e presenza di corpi apoptotici nel citoplasma (Perez *et al.* 1997). Risultati simili sono stati ottenuti anche da Bar-Joseph et al. in seguito ad analisi di oociti allo stadio di vescicola germinale (Bar-Joseph *et al.* 2010) facendo supporre una azione tossica della doxorubicina direttamente sulle cellule germinali.

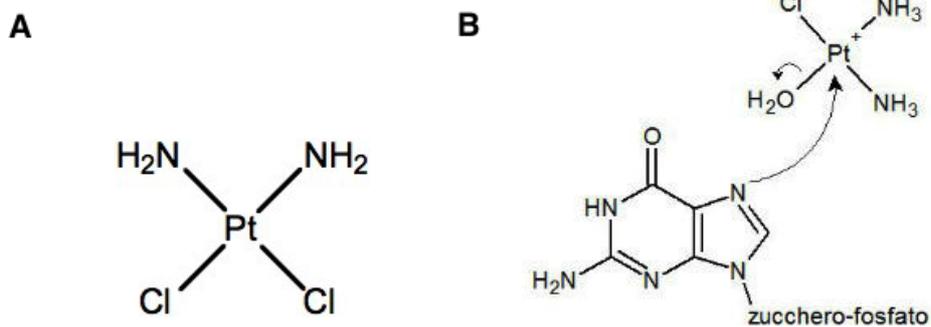
In realtà, uno studio condotto da Roti et al. ha evidenziato, utilizzando l'analisi dell'autofluorescenza della doxorubicina, che l'accumulo del farmaco a livello delle ovaie di topo avviene prima nelle cellule stromali (2 ore dopo l'iniezione) e solo successivamente nelle cellule della granulosa (4 ore dopo l'iniezione) con conseguente apoptosi follicolare (8 ore dopo l'iniezione). È possibile quindi che le cellule stromali proteggano i follicoli dall'insulto tossico sequestrando al proprio interno il farmaco. Il danno a livello degli oociti non è invece osservabile prima delle 12 ore dall'iniezione, suggerendo che esso subentra solo dopo la morte delle cellule della granulosa (Roti *et al.* 2012).

Infine, Soleimani et al. hanno studiato l'effetto di diverse concentrazioni di doxorubicina su tessuto ovarico umano crioconservato (sia in vitro, in colture di tessuto, che in vivo mediante xenotrapianto in topo) osservando

- rotture nel doppio filamento del DNA in follicoli primordiali, oociti e cellule della granulosa;
- attivazione di processi apoptotici negli oociti;
- danni a vasi sanguigni e allo stroma ovarico.

La gonadotossicità della doxorubicina è, pertanto, un processo molto complesso che coinvolge componenti germinali e non, delle ovaie umane (Soleimani *et al.* 2011).

### 1.2.2.2. Cisplatino



**Fig 3.** (A) cisplatino (B) Legame tra cisplatino monoidrato e guanina

Il cisplatino (Fig 3A) è un farmaco chemioterapico usato soprattutto per il trattamento del carcinoma del testicolo, della vescica, dello stomaco, del polmone e dell'ovaio (Dasari and Tchounwou 2014). Per il suo meccanismo d'azione viene considerato un simil-alchilante

È costituito da un atomo di Platino legato a due molecole di NH<sub>3</sub> e due atomi di Cloro. A seguito della diffusione nella cellula, la molecola viene idrolizzata alle forme monoidrato o diidrato per sostituzione sequenziale dei due atomi di cloro con molecole di acqua. Evidenze sperimentali indicano che la forma originaria è biologicamente inattiva, mentre le forme solvate risultano essere attive (Rosenberg 1985). Di queste la più frequente nelle cellule è la forma monoidrata, la cui citotossicità è legata alla capacità di interagire con i siti nucleofili come proteine cellulari, membrana plasmatica, microfilamenti del citoscheletro, RNA e DNA cellulare e mitocondriale. L'interazione con ognuna di queste componenti cellulari potrebbe essere coinvolta nel meccanismo di citotossicità indotta dal cisplatino (Jamieson and Lippard 1999); in ogni caso, il bersaglio principale risulta essere il DNA. L'atomo di azoto in posizione 7 dei residui purinici, principalmente della guanina, è particolarmente sensibile alla formazione di legami covalenti con farmaci alchilanti e simil-alchilanti, tra cui il cisplatino (Fig 3B). Si forma così un addotto monofunzionale.

Successivamente si può verificare la formazione di un secondo legame (addotto bifunzionale) con il DNA (intracatena o intercatena) o con una proteina (Eastman 1987).

Indipendentemente dal tipo di addotto formato, il processo determina delle distorsioni ultrastrutturali della doppia elica, che vengono riconosciute e legate da più di 20 tipi di proteine (Bellon *et al.* 1991) con lo scopo di riparare il danno. Nelle cellule tumorali questi meccanismi sono però molto

meno efficienti; si assiste quindi al blocco della duplicazione e della trascrizione del DNA ed, infine, a morte cellulare.

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che la morte cellulare indotta da cisplatino avviene sia attraverso meccanismi apoptotici che necrotici. Quale delle due vie venga attivata risulta essere dose-dipendente: Lieberthal et al. hanno osservato che alte dosi di cisplatino (800  $\mu\text{M}$ ) inducono necrosi in colture cellulari primarie dopo poche ore, mentre dosi molto più basse (8  $\mu\text{M}$ ) determinano apoptosi (Lieberthal *et al.* 1996).

La somministrazione di cisplatino causa la comparsa di molti effetti collaterali, tra cui tossicità gonadica con conseguente rischio di fallimento ovarico precoce. Il cisplatino è classificato come un farmaco a rischio intermedio di gonadotossicità. Attualmente si sa molto poco sui meccanismi con cui ciò avviene.

Uno studio condotto da Morgan et al. ha evidenziato che, mentre la doxorubicina causa danni soprattutto a livello delle cellule della granulosa dei follicoli in stadi maturativi avanzati, il cisplatino danneggia soprattutto gli oociti di follicoli primari (Morgan *et al.* 2013): esplica quindi la sua funzione tossica su cellule quiescenti, a differenza della doxorubicina che invece danneggia cellule in attivo stato replicativo.

Tale capacità del cisplatino è nota in letteratura: il principale effetto collaterale del farmaco, la neurotossicità, è infatti legata alla sua azione tossica sulle cellule neuronali, cioè cellule quiescenti. In questo caso l'effetto tossico si esplica sia attraverso la formazione degli addotti, sia attraverso la generazione di radicali liberi come anione superossido e ossido nitrico. Vari autori riportano, infatti, che in animali riceventi dosi ototossiche di cisplatino si ha una riduzione degli antiossidanti cellulari che può derivare:

- dal legame diretto del cisplatino con i gruppi sulfidrilici degli enzimi;
- dalla deplezione del rame e del selenio che sono essenziali per il funzionamento della superossido dismutasi e della glutazione perossidasi;
- dall'aumento dei radicali liberi dell'ossigeno e di perossidi organici che inattivano gli enzimi antiossidanti;
- dalla deplezione di glutazione e NADPH, essenziali per la funzionalità della glutazione perossidasi e glutazione reduttasi.

L'inibizione degli enzimi antiossidanti, dovuta al cisplatino, permette la produzione di ROS che vanno a danneggiare proteine, DNA, carboidrati ma

soprattutto i lipidi. La perossidazione lipidica che ne deriva, determina alterazioni nella fluidità delle membrane cellulari e formazione di malonildialdeide (o MDA, prodotto finale dell'ossidazione lipidica), una sostanza altamente tossica per la cellula (Rybak *et al.* 2007).

Recentemente Li *et al.* analizzando cellule della granulosa di ovaia di ratto, hanno ipotizzato che anche l'effetto gonadotossico potrebbe essere legato alla capacità del cisplatino di generare stress ossidativo nelle cellule follicolari. Confrontando ovaie di ratto non trattate con ovaie trattate con cisplatino, gli autori hanno individuato un notevole aumento dei livelli di MDA e un'elevata riduzione dell'attività enzimatica antiossidante della superossido dismutasi e glutatione perossidasi (Li *et al.* 2013). Lo studio indica quindi che la gonadotossicità del cisplatino è legata alla capacità del farmaco di indurre stress ossidativo nelle cellule della granulosa, con conseguente apoptosi di quest'ultime e degenerazione follicolare.

Apoptosi cellulare in ovaie di topi sottoposti a somministrazioni intraperitoneali di cisplatino, è stata osservata anche da Chen *et al.*: il tessuto ovarico del gruppo trattato, se comparato con il controllo, presenta riduzione dell'espressione di Bcl-2, aumentata espressione di Bax ed elevato indice apoptotico (Chen *et al.* 2015).

### **1.3. Preservare la funzione gonadica: Crioconservazione del tessuto ovarico**

I progressi nella diagnosi e nel trattamento dei tumori in bambini, adolescenti e adulti, hanno migliorato le aspettative di vita delle donne in premenopausa con cancro, ma hanno portato ad un aumento dei soggetti con problemi di infertilità dovuta a fallimento ovarico precoce.

Oggi esistono tecniche che permettono di preservare la funzione gonadica e la fertilità.

Tecniche molto utilizzate sono il congelamento di embrioni, di ovociti e di tessuto ovarico prima dell'inizio del trattamento antitumorale.

La *crioconservazione di embrioni* è una tecnica che può essere applicata solo in donne che hanno un partner (richiesto per la fecondazione in vitro). Questa necessita di un ciclo di stimolazione ovarica di circa due settimane per il recupero di oociti maturi in Metafase II, che ne impedisce l'utilizzo nel caso in cui l'inizio della chemioterapia non possa essere ritardata, quando il tumore è ormono-sensibile (per esempio tumore alla mammella e tumore all'endometrio) e nelle pazienti prepuberi che non hanno ancora avuto il menarca.

Anche la *crioconservazione di ovociti* in Metafase II necessita di un ciclo di stimolazione presentando i limiti precedentemente indicati per la crioconservazione degli embrioni. A differenza di quest'ultima, può però essere effettuata anche in donne single. Ulteriore limite di questa tecnica è la possibilità di prelevare un numero di oociti molto ridotto. Gli ovociti in metafase II, inoltre, sono molto suscettibili ai danni derivanti dal congelamento/scongelo, quindi, la quantità di oociti utilizzabili è limitata. Infine la tecnica permette la conservazione della sola funzione gametogenica della donna.

Un'alternativa al congelamento di embrioni o di ovociti, che permette di conservare sia la funzionalità gametogenica che steroidogenica (produzione di ormoni), è la *crioconservazione del tessuto ovarico*.

Questa procedura consiste nel prelievo di porzioni di ovaio attraverso laparoscopia, eliminazione della midollare, taglio della corticale ovarica in sottili fettine e loro congelamento. Una volta che la paziente è stata dichiarata libera dalla malattia, le fettine di corticale ovarica possono essere scongelate e reimpiantate.

La procedura, diversamente dalle tecniche precedenti, può essere effettuata in qualsiasi fase del ciclo mestruale e non richiede stimolazione ormonale. È quindi indicata nelle donne che necessitano di iniziare immediatamente la terapia, in quelle che hanno tumori ormono-sensibili e rappresenta l'unica opzione per le pazienti prepuberi che non hanno ancora avuto il menarca.

Ulteriore vantaggio sta nel fatto che la crioconservazione del tessuto permette di preservare un elevato numero di follicoli primordiali, in quanto resistenti ai danni da congelamento essendo di piccole dimensioni, privi di zona pellucida e metabolicamente quiescenti (Fabbri *et al.* 2010).

La quantità di follicoli è in ogni caso inversamente proporzionale all'età della paziente: è, infatti, ben documentato come la riserva ovarica si riduca drasticamente dai 35 anni in poi. Per questo motivo, la tecnica non viene effettuata in donne con età maggiore di 38 anni in cui la riserva ovarica follicolare risulta essere già fisiologicamente compromessa (Oktay *et al.* 2002). La crioconservazione del tessuto ovarico è, invece, indicata nelle donne affette sia da patologie maligne che benigne (Donnez *et al.* 2006):

1. Malattie maligne:

- Patologie extrapelviche: osteosarcoma, sarcoma di Ewing, carcinoma mammario, tiroideo ed epatocellulare, melanoma, neuroblastoma, tumore dell'intestino;

- Patologie pelviche non ginecologiche: sarcoma pelvico, tumore sacrale, rhabdomyosarcoma, tumore retto-sigmoidale;
  - Patologie pelviche ginecologiche: carcinoma cervicale, vaginale e della cervice;
  - Malattie sistemiche: linfoma di Hodgkin, linfoma non-Hodgkin, leucemie, medulloblastoma.
2. Malattie benigne:
- Patologie che necessitano di ooforectomia unilaterale o bilaterale: tumori benigni dell'ovaio, endometriosi severa e ricorrente, cisti ovariche ricorrenti;
  - Patologie genetiche associate a scarsa presenza di follicoli ovarici: sindrome di Turner, Galattosemia, storia familiare di fallimento ovarico precoce;
  - Patologie ematologiche benigne che necessitano di trapianto di midollo osseo: anemia falciforme, talassemia major, anemia aplastica;
  - Malattie autoimmuni/infiammatorie: lupus eritematoso, artrite reumatoide, morbo di Chron, sclerosi multipla.

Controindicazioni assolute sono invece patologie ad alto rischio di metastasi ovarica, presenza di tumori ovarici maligni ed elevato rischio chirurgico dall'intervento di laparoscopia per la paziente.

### **1.3.1. Procedura di crioconservazione del tessuto ovarico**

La procedura di crioconservazione del tessuto ovarico utilizza il congelamento lento/scongelo rapido.

Nel *congelamento lento* i campioni di tessuto vengono posti in una soluzione contenente crioprotettori, cioè sostanze aventi lo scopo di proteggere il tessuto biologico dai danni derivanti dal congelamento: questi riducono la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare incrementando il processo di disidratazione ed evitano danni da stress osmotico durante lo scongelamento (Fabbri *et al.* 2003).

I crioprotettori possono essere divisi in due gruppi: permeanti la membrana e non permeanti.

- I crioprotettori permeanti sono composti oligo-idrossilici di basso peso molecolare che penetrano rapidamente nella cellula per osmosi. Una volta dentro la cellula, determinano un abbassamento della temperatura di congelamento del citoplasma cellulare riducendo quindi la formazione di cristalli di ghiaccio. I principali

crioprotettori permeanti utilizzati sono propandiole (PROH), dimetilsolfossido (DMSO), glicerolo e glicole etilenico.

- I crioprotettori non permeanti sono molecole di grandi dimensioni che non penetrano nella cellula. Aumentando la concentrazione dei soluti extracellulari, generano un gradiente osmotico attraverso la membrana plasmatica, che porta allo spostamento di acqua fuori dalla cellula. Si ha così disidratazione prima del congelamento. I più utilizzati sono glucosio, saccarosio e trealosio.

Durante il congelamento, i tessuti biologici vengono sottoposti ad una riduzione graduale della temperatura. Inizialmente i campioni, posti nella soluzione di congelamento in contenitori detti cryovials, sono mantenuti alla temperatura di 4°C per permettere ai crioprotettori permeanti di penetrare nelle cellule e sostituirsi all'acqua. A questo punto i campioni vengono posti in un criocongelatore programmabile che riduce lentamente la temperatura da 0°C a -140°C. Infine i cryovials vengono stoccati in appositi contenitori contenenti azoto liquido ad una temperatura di -196°C (Fabbri et al. 2003).

Lo scongelamento rapido prevede la rimozione dei crioprotettori attraverso passaggi del tessuto congelato in soluzioni contenenti diluizioni graduali del crioprotettore permeante. I tessuti vengono poi mantenuti in una soluzione priva di crioprotettori per permetterne la reidratazione.

Nel corso degli anni molti studi sono stati fatti per migliorare il protocollo di crioconservazione ai fini di ridurre al minimo i danni al tessuto.

Nel 2006 Fabbri et al. hanno eseguito uno studio dimostrando che il siero umano al 30% nelle soluzioni di congelamento, rappresenta il supporto proteico che fornisce il più alto tasso di sopravvivenza dei follicoli nel tessuto ovarico scongelato, se paragonato con l'utilizzo di concentrazioni minori di Fetal Calf Serum e di siero sintetico (Fabbri et al. 2006).

Nel 2010, lo stesso gruppo ha analizzato gli effetti di diverse concentrazioni di PROH, saccarosio (crioprotettori) e siero umano valutandone gli effetti sulla preservazione delle strutture cellulari attraverso microscopia elettronica ed ottica. I risultati ottenuti indicano che la soluzione di congelamento migliore è quella contenente saccarosio 0.175M, PROH 1,26M e siero umano al 30% (Fabbri et al. 2010).

### **1.3.2. Impieghi del tessuto ovarico crioconservato**

Una volta che la paziente è stata dichiarata libera dalla malattia, il tessuto ovarico crioconservato può essere scongelato ed autotrapiantato nella donna

con lo scopo di ripristinarne la funzionalità gonadica. Il reimpianto può avvenire sia in sede ortotopica che eterotopica.

1. Il *reimpianto ortotopico* (Fig 4) prevede il trapianto di corticale ovarica nella sede originale, cioè nella cavità pelvica. Può essere effettuato:

- se almeno un ovaio è presente, sulla porzione di midollare decorticata dell'ovaio;
- se le ovaie sono assenti, in una tasca peritoneale.



**Fig 4.** Fettine di corticale ovarica reimpiantate nell'ovaio

In questo caso è possibile il ripristino sia della funzionalità endocrina sia della capacità di concepire in maniera spontanea.

Uno studio condotto da Donnez et al. riporta il ripristino dell'attività ovarica, dopo trapianto ortotopico, in 52 donne su 56 analizzate (93%). In 3 delle donne che non hanno mostrato riattivazione dell'attività ovarica non sono stati ritrovati follicoli nei frammenti di corticale reimpiantati, ad indicare come la loro presenza sia fondamentale per la ripresa dell'attività (Donnez *et al.* 2013). In aggiunta, Ernst et al. hanno riportato la comparsa della pubertà in una bambina in cui era stato effettuato prelievo di tessuto ovarico all'età di 9 anni e reimpiantato a livello ortotopico circa 5 anni dopo (Ernst *et al.* 2013).

Ad oggi è documentata la nascita di 89 bambini nel mondo da trapianto ortotopico, di cui più del 50% in maniera spontanea (Congresso SIGO 2016). Nel 2015 è stata documentata per la prima volta, da Demesteere et al., la nascita in una ragazza in cui era stato effettuato prelievo di tessuto ovarico in età prepuberale (Deemestere *et al.* 2015).

2. Il *reimpianto eterotopico* (Fig 5) di tessuto ovarico viene effettuato in una sede vascolarizzata diversa da quella di origine, come il sottocute dell'addome e il sottocute dell'avambraccio.



*Fig 5. Fettine di corticale ovarica reimpiantate nel sottocute dell'addome*

In questo modo è possibile ottenere la ripresa della funzionalità endocrina, mentre l'instaurarsi di una gravidanza è possibile solo mediante recupero di ovociti maturi da usare in un programma di riproduzione assistita.

Ad oggi è riportata la ripresa della funzione ovarica nell'80-90% dei casi di trapianto eterotopico (Kim 2012) e l'induzione della pubertà in una bambina (Poirot *et al.* 2012). Recentemente è stata anche riportata la nascita di due gemelli in seguito a fecondazione in vitro di ovociti maturi prelevati da tessuto ovarico trapiantato nel sottocute dell'addome (Stern *et al.* 2013).

### **1.3.3 Effetti biologici della procedura di crioconservazione**

Nel corso del processo di crioconservazione, le cellule sono sottoposte a diversi tipi di forze (termiche, chimiche e meccaniche) che possono determinare un'alterazione delle loro funzioni biologiche. (Friedler *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 2001). I danni da congelamento sono causati principalmente dalla formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare ma anche dall'aumento della concentrazione dei soluti (Pegg, 2002). La formazione di ghiaccio intracellulare, che può verificarsi sia durante la fase di congelamento che in quella di scongelamento, crea danni non solo alle membrane fosfolipidiche, ma anche agli organelli citoplasmatici. L'entità di questi danni è direttamente proporzionale al volume totale del ghiaccio e alla dimensione di ogni singolo cristallo.

Il ghiaccio intracellulare e il flusso osmotico possono danneggiare non solo la membrana citoplasmatica (diminuzione dei componenti, tagli meccanici e cambiamenti conformazionali) (Fujikawa, 1980), ma anche la membrana degli organelli interni (Mazur, 1966).

Inoltre, sia la formazione di bolle gassose durante il congelamento, come conseguenza dell'instaurarsi di forze non-meccaniche (Morris, 1981 e Ashwood et al., 1988), che i cambiamenti osmotici dovuti allo scioglimento del ghiaccio intracellulare durante lo scongelamento, possono alterare le componenti cellulari (Farrant, 1977).

Durante lo scongelamento possono verificarsi due eventi che riducono la sopravvivenza delle cellule congelate: la ricristallizzazione con la formazione di ghiaccio intracellulare e lo shock osmotico.

Durante la ricristallizzazione l'acqua rientra nella cellula e si dispone intorno ai piccoli cristalli di ghiaccio che si sono formati nel citosol, aumentandone le dimensioni. Questo processo si verifica quando la temperatura viene innalzata a  $-40^{\circ}\text{C}$ : l'acqua rientra nella cellula e forma legami idrogeno col ghiaccio presente. Tutto questo è influenzato sia dalla velocità di congelamento, sia da quella di scongelamento. Se il congelamento è stato rapido, può accadere che la cellula non si sia sufficientemente disidratata e quindi possono formarsi piccoli cristalli di ghiaccio nel citosol. In questo caso, se viene effettuato uno scongelamento lento, i cristalli di ghiaccio potrebbero aumentare di dimensione, se invece viene effettuato uno scongelamento rapido (circa  $275^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), questo fenomeno può essere evitato in quanto permette una dispersione molto rapida dei cristalli di ghiaccio intracitoplasmatici: il ghiaccio extracellulare allo stato liquido entra attraverso la membrana e reidrata la cellula (Friedler et al., 1988).

Lo shock osmotico potrebbe verificarsi durante lo scongelamento rapido se il crioprotettore permeato nella cellula non diffonde fuori con una velocità adeguata per prevenire l'afflusso massivo d'acqua verso l'interno col susseguente scoppio della cellula.

Quindi, sono due i fattori importanti da considerare al fine di ridurre i possibili danni durante le fasi di congelamento/scongelamento:

- 1) minimizzare il tempo di contatto delle cellule col crioprotettore a temperatura ambiente perché può essere citotossico;
- 2) evitare l'instaurarsi del fenomeno di shock osmotico che può provocare la lisi cellulare.

#### **1.3.4 Protezione dai danni da congelamento: Agenti antiossidanti**

La crioconservazione del tessuto ovarico seppur considerata una tecnica molto promettente per preservare la funzione gonadica in donne che devono ricorrere a terapie antitumorali, potrebbe comportare una riduzione del 30% del pool follicolare e una sub-ottimale preservazione stromale a causa dei fenomeni sopra descritti. Gli studi condotti per preservare la fertilità, stanno mostrando un sempre crescente interesse per la valutazione fattori che influenzano negativamente la vitalità del tessuto ovarico e considerano lo stress ossidativo uno dei principali fattori coinvolti.

Il metabolismo aerobico comporta la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS, come ad esempio l'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ), il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ) e il radicale ossidrilico ( $OH^{\cdot}$ ), sono delle molecole altamente instabili derivate dall'ossigeno che tendono a reagire con vari componenti cellulari, proteine, lipidi e DNA, alterandoli strutturalmente e funzionalmente, provocando un danno cellulare se presenti a livelli elevati. Tuttavia, come evidenziano Brookes et al. 2004, i ROS non sono solo coinvolti in processi patologici di danno cellulare, invecchiamento ed apoptosi, ma sono anche fattori importanti nel "cell signaling" all'interno dei vari compartimenti cellulari (Brookes et al. 2004).

Una significativa fonte di radicali dell'ossigeno è il mitocondrio, vera e propria "centrale energetica" della cellula, nel quale hanno luogo la fosforilazione ossidativa, a livello della catena respiratoria nella membrana mitocondriale interna, e altre importanti reazioni metaboliche.

I radicali liberi dell'ossigeno sono prodotti anche in altri distretti cellulari, nel corso delle normali reazioni metaboliche o, per esempio, in risposta a stimoli infiammatori: sono infatti responsabili della sintesi di  $O_2^{\cdot-}$  anche il complesso della NADPH ossidasi, presente in neutrofilo, eosinofilo, monociti e macrofagi, e la Xantina ossidasi che converte ipoxantina e xantina in acido urico nel corso della degradazione delle purine (Goud et al., 2007).

La cellula dispone di numerosi sistemi scavenger di rimozione delle specie reattive dell'ossigeno, che prevengono i danni cellulari derivanti dall'accumulo delle stesse. Esempi sono enzimi quali la superossido dismutasi che rimuove l' $O_2^{\cdot-}$  trasformandolo in  $H_2O_2$ , la glutazione perossidasi che riduce l' $H_2O_2$  ad  $H_2O$  ossidando due molecole di glutazione o la catalasi, presente nei perossisomi, che converte due molecole di  $H_2O_2$  in due molecole di acqua e una di ossigeno. Albumina, transferrina e ferritina chelano metalli come il ferro o il rame inibendo così la reazione di sintesi

del radicale ossidrilico (Fenton reaction); lo stesso ruolo antiossidante svolge probabilmente la ferritina che trasporta il ferro dai mitocondri al citosol. Un'alterazione dell'equilibrio tra sintesi e rimozione dei ROS si traduce necessariamente in un accumulo degli stessi e in un aumento del rischio di danno cellulare. I ROS infatti, reagendo con i gruppi tiolici e carbonilici delle proteine possono danneggiare sistemi enzimatici o di trasporto, provocando disfunzioni metaboliche o compromettendo gli equilibri elettrolitici ed osmotici della cellula. Il radicale ossidrilico innesca la perossidazione lipidica alterando così l'integrità e la fluidità delle membrane cellulari, inoltre le aldeidi lipidiche prodotte da questa reazione possono reagire con i gruppi tiolici o amminici delle proteine formando degli aggregati macromolecolari, le lipofuscine. Anche gli acidi nucleici sono bersaglio dell'azione dei ROS che si espleta attraverso l'ossidazione di basi azotate (es. 8-ossiguanosina) e, conseguentemente, errori di appaiamento alla replicazione del DNA (mismatch), formazione di cross-linking inter- o intra-catena, e rotture a singolo o doppio filamento (Mathews et al., 2004).

Durante i processi di crioconservazione è possibile registrare stress osmotico, tossicità e cambi delle condizioni chimico-fisiche a livello cellulare, conseguenza dell'utilizzo di elevate concentrazioni dei crioprotettori nelle soluzioni di congelamento, che potrebbero sfociare nella produzione delle specie reattive dell'ossigeno. Un tessuto che ha una elevata produzione di specie reattive dell'ossigeno, riduce la sua tolleranza agli stress indotti durante l'abbassamento della temperatura, quindi risulta più sensibile ai processi di crioconservazione (Rahimi et al., 2003).

E' ragionevole ipotizzare che l'impiego di agenti antiossidanti esogeni durante la procedura di crioconservazione costituisca una strategia utile per preservare la funzionalità dei sistemi endogeni cellulari. Dati della letteratura riportano che l'aggiunta di L-Glutammina e Taurina alle soluzioni di crioconservazione migliora la preservazione del tessuto ovarico (Sanfilippo et al., 2013). L'impiego di vitamina E ed acido ascorbico riduce il danno ischemico del tessuto ovarico dopo reimpianto avascolare favorendo la sopravvivenza del tessuto reimpiantato (Demeestere et al., 2009). L'aggiunta di N-Acetilcisteina, NAC, migliora la preservazione del tessuto ovarico nelle colture cellulari a lungo termine (Fabbri et al., 2007) e l'aggiunta di IAC, bis(1-idrossi-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)decandioato, in differenti frazioni subcellulari, colture cellulari, sangue periferico, fegato e nell'animale in toto riduce i livelli di SRR (Valgimigli et al., 2001).

#### **1.4. Preservare la funzione gonadica: Protezione farmacologica**

Nello scenario di preservazione della funzione ovarica molto dibattuta è anche l'efficacia della somministrazione degli analoghi del GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) e dell' LH come protettori della funzione gonadica se somministrati in associazione a chemioterapia. Gli analoghi del GnRH, rilasciato in modo pulsatile dall'ipotalamo, stimola la secrezione ipofisaria delle gonadotropine LH ed FSH, a loro volta responsabili della funzionalità gonadica. La somministrazione continua di un analogo del GnRH, determina la desensibilizzazione dei recettori ipofisari per il GnRH determinando, quindi, la soppressione della secrezione delle gonadotropine ed una momentanea cessata funzionalità gonadica. Le cellule follicolari vengono in questo modo mantenute in uno stato di quiescenza, risultando meno sensibili ai trattamenti chemioterapici. Gli studi effettuati sulla capacità degli agonisti del GnRH di ridurre il rischio di fallimento ovarico precoce, hanno però fornito risultati discordanti (Blumenfeld et al. 2015).

L'LH è un ormone glicoproteico, della famiglia delle gonadotropine, rilasciato dopo la pubertà ed avente lo scopo di regolare la funzionalità delle gonadi. Il legame con il suo recettore- presente su cellule della granulosa, cellule della teca, cellule luteali e cellule stromali (Ascoli *et al.* 2002) - induce una serie di reazioni intracellulari fondamentali per la maturazione del follicolo, per l'ovulazione e per la formazione/funzionalità del corpo luteo.

La prima fase di maturazione follicolare è indipendente da stimoli ormonali. Successivamente, affinché il processo maturativo proceda, è necessaria l'entrata in gioco dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) e dell'LH; in caso contrario, il follicolo andrà incontro ad atresia per apoptosi cellulare. L'LH svolge, quindi, un ruolo importante nel prevenire i fisiologici processi apoptotici a cui i follicoli ovarici andrebbero altrimenti in contro. Secondo uno studio condotto da Tilly et al., un ruolo importante nell'inibire la frammentazione spontanea del DNA, a cui segue l'apoptosi follicolare, sarebbe svolto dall'epidermal growth factor (Tilly *et al.* 1992). Questo fattore di crescita sembrerebbe essere espresso a livello delle cellule della teca sotto stimolo dell'LH (Ahkenazi *et al.* 2005; Ruvolo *et al.* 2007).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Il primo obiettivo del presente studio è stato valutare l'effetto dell'antiossidante N-Acetilcisteina (NAC) sulle caratteristiche morfo-funzionali del tessuto ovarico sottoposto alla procedura di crioconservazione. È stata scelta la NAC in quanto ampiamente utilizzata in campo umano per prevenire/ridurre i danni indotti dallo stress ossidativo in numerose patologie quali cancro, malattie cardiovascolari, HIV, disordini neurologici e patologie del fegato.

Il secondo obiettivo del progetto è stato valutare l'effetto della NAC e dell'ormone luteinizzante (LH) in coltura di cellule stromali isolate da tessuto ovarico trattato in vitro con doxorubicina (DOX) e cisplatino (CIS), chemioterapici comunemente utilizzati nei regimi terapeutici dei linfomi, carcinomi mammari e sarcomi.

Lo studio si è articolato in due principali fasi:

### ***1) Valutazione dell'effetto antiossidante della NAC sul tessuto ovarico sottoposto alla procedura di crioconservazione***

- Aggiunta della N-Acetilcisteina (NAC) alle soluzioni utilizzate durante la procedura di crioconservazione del tessuto ovarico al fine di valutare gli effetti di tale sostanza sulla produzione delle specie radicaliche dell'ossigeno (SRR) e sulla morfologia cellulare.

### ***2) Valutazione dell'effetto della NAC e dell'LH su tessuto ovarico trattato in vitro con DOX e CIS***

- Isolamento e coltura di cellule stromali da tessuto ovarico crioconservato.
- Caratterizzazione delle cellule stromali in coltura mediante analisi morfologica, ultrastrutturale, immunologica e molecolare.
- Valutazione della citotossicità di DOX e CIS sulle cellule in coltura mediante tecniche morfologiche, saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD e saggio della sulforodamina B.
- Valutazione degli effetti dei farmaci DOX e CIS su l'indice apoptotico (Bax/Bcl2, PARP1 e caspasi 9) e l'indice di proliferazione e differenziamento (Akt1 e MAPK/ERK1/2).
- Analisi preliminari sono state condotte al fine di valutare la capacità della NAC e dell'LH di contrastare i danni indotti da DOX e CIS sullo stroma ovarico umano.

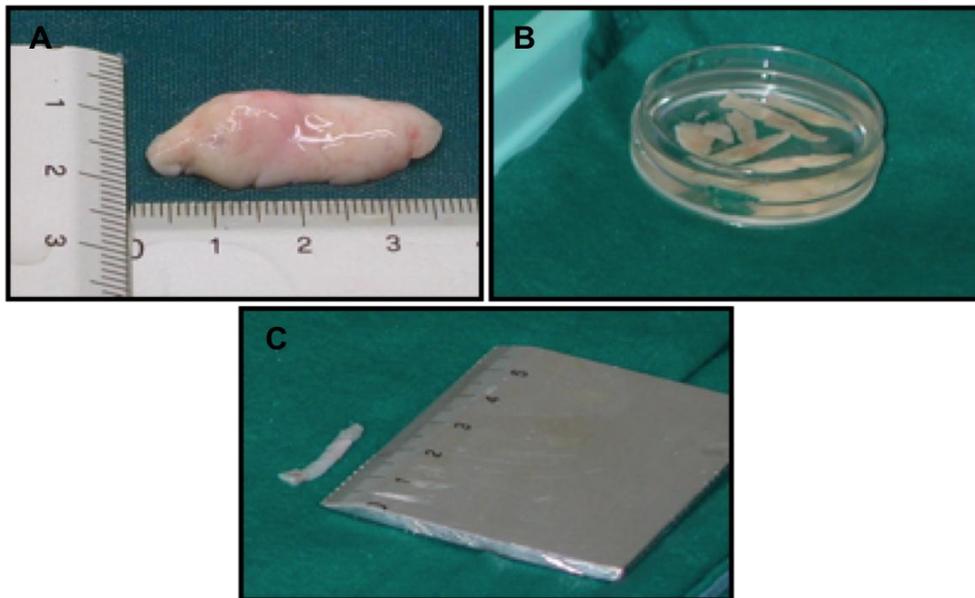
### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Prelievo del tessuto ovarico

Il tessuto ovarico è stato prelevato per via laparoscopica e crioconservato seguendo il protocollo di congelamento lento/scongelo rapido approvato dal Comitato Etico del Policlinico S. Orsola–Malpighi di Bologna (Sperimentazione clinica 74/2001/0 approvata in data 13/02/2002).

Il tessuto ovarico prelevato è stato immediatamente posto in una soluzione di mantenimento, composta da tampone fosfato salino (PBS) di Dulbecco (*Gibco, Life Technologies LTD, Paisley, Scotland*) supplementato con il 10% di siero umano scomplementato (fornito dal Centro Trasfusionale dell’Ospedale S. Orsola – Malpighi di Bologna) e trasportato in laboratorio. Una volta in laboratorio, si è immediatamente provveduto ad eliminare la midollare dalla biopsia per isolare la corticale, cioè la porzione contenente il pool follicolare. Quest’ultima, mediante l’ausilio di un bisturi, è stata poi tagliata in sottili fettine di dimensioni medie di circa 1cm x 2mm x 1mm (*Fig 6A-B-C*).

Tutta la procedura è stata eseguita in condizioni di sterilità usando materiale sterile, sotto una cappa a flusso laminare verticale e mantenendo il tutto in ghiaccio.



**Fig 6.** (A) Biopsia di tessuto ovarico; (B) Fettine di corticale ovarica; (C) Fettina di corticale ovarica.

## 3.2. Protocollo di crioconservazione del tessuto ovarico: congelamento lento/scongelamento rapido

### 3.2.1. Congelamento lento

Le fettine di corticale sono state poste separatamente in cryovials (*Intermed Nunc Cryotubes, Denmark*) contenenti 1,8mL di soluzione di congelamento. Quest'ultima è costituita da (Fabbri *et al.* 2010):

- Saccarosio 0.175 M (*Sucrose, Sigma-Aldrich SrL, Milano, Italy*) come crioprotettore non permeante disciolto in PBS
- PROH 1.26 M (*Fluka, Chemica, Sigma-Aldrich SrL, Milan, Italy*) come crioprotettore permeante
- 30% di siero umano scomplementato come supporto proteico

Durante la prima fase, i cryovials sono tenuti a temperatura di 4°C per un'ora per permettere al crioprotettore permeante di penetrare nelle cellule e sostituirsi all'acqua. A questo punto i campioni vengono posti in un criocongelatore programmabile (Planer Kryo 10/1,7 Serie III, *SAPIO Life*) (*Fig 7A*) che riduce lentamente la temperatura da 0°C a -9°C per poi mantenerli a questa temperatura per 10'. Durante questa fase viene effettuato il "seeding" (*Fig 7B*), cioè l'induzione manuale del primo nucleo di ghiaccio. In questo modo si evita l'effetto negativo dei cambiamenti termici che comprometterebbero la sopravvivenza del tessuto.

Il passaggio successivo prevede la riduzione della temperatura da 0 a -40°C attraverso lievi decrementi (circa 0.3°C al minuto) ed in fine a -140°C con diminuzioni della temperatura di 10°C al minuto. Infine i cryovial vengono prelevati dal criocongelatore e stoccati, in appositi contenitori di plastica, in azoto liquido (temperatura di -196°C) (*Fig 7C*).



*Fig 7. (A) Planer Kryo10/1,7 Serie III SAPIO; (B) Seeding; (C) Stoccaggio in azoto liquido*

### 3.2.2. Scongelo rapido

Il tessuto ovarico è stato scongelato, secondo il protocollo di scongelamento rapido. Lo scongelamento rapido prevede che i cryovials contenenti le fettine di corticale, una volta estratti dall'azoto liquido, siano mantenuti per 30 secondi a temperatura ambiente e successivamente posti in acqua calda a 37°C per 2'.

A questo punto, la fettina di corticale è posta in quattro soluzioni di scongelamento a molarità decrescenti di PROH al fine di ottenere la rimozione dei crioprotettori e la reidratazione del tessuto (*Fig 8*).

- Incubazione per 5' in SOLUZIONE 1:  
PBS + 0.76 M PROH + 0.175 M saccarosio + 30% siero umano
- Incubazione per 5' in SOLUZIONE 2:  
PBS + 0.26 M PROH + 0.175 M saccarosio + 30% siero umano
- Incubazione per 10' in SOLUZIONE 3:  
PBS + 0.175 M saccarosio + 30% siero umano
- Incubazione per 20' in SOLUZIONE 4:  
PBS + 30% siero umano



*Fig 8. Soluzioni di scongelamento a molarità decrescenti di PROH*

### **3.3 Valutazione dell'effetto antiossidante della NAC sul tessuto ovarico sottoposto alla procedura di crioconservazione**

#### **3.3.1 Pazienti**

Il tessuto ovarico è stato ottenuto da 10 pazienti affette da patologie oncologiche (5 linfomi di Hodgkin, 4 carcinomi alla mammella e 1 sarcoma di Ewing), di età compresa tra 17-25 anni (media età±deviazione standard – SD- 26.2 ± 6.5) che si sono rivolte all'Unità Operativa di Ginecologia e Fisiopatologia della Riproduzione Umana dell'Ospedale Sant'Orsola-Malpighi di Bologna per la crioconservazione del tessuto ovarico prima dell'inizio dei trattamenti antitumorali. Tutte le pazienti sono state informate dello studio ed hanno firmato un consenso informato.

Il tessuto ovarico è stato suddiviso in campioni, dei quali uno per ciascuna paziente è stato immediatamente processato per le analisi (t0, tessuto fresco), mentre i rimanenti sono stati sottoposti alla procedura di crioconservazione in presenza e assenza di N-Acetilcisteina (NAC 25 mmol/l - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Dopo 1 mese di stoccaggio in azoto liquido, un campione crioconservato di ciascuna paziente è stato scongelato e suddiviso in due parti: una processata per le analisi (t1, tessuto appena scongelato; t1 NAC appena scongelato in presenza di NAC), mentre la rimanente è stata mantenuta a 4°C per 2 ore in alfa-MEM (Alpha Minimum Essential Medium, *Sigma, Italy*) addizionato di antibiotici e siero umano, per consentire la ri-equilibratura del tessuto, e successivamente processato per le analisi (t2, tessuto mantenuto a 4°C per 2 ore; t2 NAC, tessuto mantenuto a 4°C per 2 ore in presenza di NAC). Il NAC è stato addizionato a tutte le soluzioni utilizzate: soluzione di mantenimento, congelamento e scongelamento.

Su ciascun campione sono state eseguite le seguenti indagini:

- a) spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica, utilizzata per valutare i livelli di SRR prodotti durante l'intera procedura di crioconservazione;
- b) microscopia ottica ed elettronica, utilizzate per valutare la preservazione del tessuto ovarico prima e dopo crioconservazione.

#### **3.3.2. Spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica (EPR)**

Per ciascuna paziente, i campioni t0, t1, t1 NAC, t2 e t2 NAC sono stati processati per l'analisi EPR.

La sonda utilizzata nell'analisi EPR per valutare i livelli delle specie radicaliche dell'ossigeno (SRR) è stata un'idrossilammina bis(1-idrossi-2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinil)decandioato (IAC) capace di interagire efficacemente con la maggior parte dei radicali liberi dell'ossigeno, carbonio e azoto (Valgimigli et al., 2000, 2001, 2002; Paolini et al., 2003).

La reazione è stata preparata facendo reagire 0.2 g di tessuto con 0.5 ml di una soluzione contenente IAC (1mM) e deferoxamina (1 mM), un agente chelante. Dopo 5 minuti di incubazione a 37°C, ciascun campione è stato congelato in azoto liquido per stoppare le reazioni cellulari e stoccato a -80°C fino al momento dell'analisi (Valgimigli et al., 2000, 2001, 2002; Paolini et al, 2003).

Immediatamente prima delle analisi, i campioni sono stati scongelati e circa 50 µl di soluzione sono stati caricati nello spettrometro Bruker ESP 300 EPR (Bruker Biospin Srl, Rheinstetten, Germany).

Lo spettro dello ione nitrossido, generato dalla reazione dello IAC con i radicali liberi presenti nel tessuto ovarico, è stato registrato usando i seguenti parametri: ampiezza di modulazione del campo 1.0 G; tempo di conversione 163.84 ms; costante di tempo 163.84 ms; frequenza di modulazione del campo 100 kHz; potenza di microonde 6.4 mW. L'intensità della prima linea dello spettro dello ione nitrossido ( $a_N=16.60$  G;  $g=2.0056$ ) è stata usata per ottenere la quantità assoluta di ione nitrossido per ml di campione. La calibrazione dello spettrometro è stata effettuata con una soluzione a concentrazione nota di colina in acqua, utilizzando uno standard interno. Per semplicità i risultati sono stati espressi come µmol of SRR misurate nel tessuto ovarico espresso in g.

Sono stati preparati ed analizzati anche campioni contenenti la sola idrossilammina e DFO in soluzione fisiologica al fine di valutare l'ossidazione dell'idrossilammina da parte dell'ossigeno atmosferico. I valori ottenuti in questa reazione sono stati sottratti ai valori ottenuti nelle analisi dei campioni di tessuto ovarico, in modo da eliminare l'effetto di ossidazione spontanea dello IAC.

### **3.3.3. Microscopia ottica**

I campioni di tessuto ovarico da sottoporre all'analisi istologica sono stati fissati in formalina al 2% e mantenuti a temperatura ambiente. L'inclusione dei campioni in paraffina è stata effettuata seguendo una procedura automatizzata che sfrutta lo strumento TPC 15 Tissue Processing Center della Medite. I campioni una volta inclusi sono stati tagliati in sezioni dello

spessore di 5 µm e sottoposti alle procedure di colorazione. Alcune sezioni sono state colorate con ematossilina/eosina mentre sulle altre è stata effettuata la tecnica TUNEL e la colorazione immunohistochimica per l'anticorpo Ki67.

### **3.3.3.1 TUNEL assay**

Il TUNEL assay è una tecnica che consente di stimare l'incidenza di apoptosi all'interno dei campioni. Come prima operazione le fettine di tessuto ovarico sono state permeabilizzate con 20 µg/ml di Proteinasi K (Gibco BRL) in 10 mM Tris pH 7,5 e 5 mM di EDTA e lasciate incubare per 30' a 37°C. A questo punto i campioni di tessuto ovarico sono stati fatti reagire con la soluzione TUNEL MIX e lasciati incubare per 1 ora a 37°C al buio. Al termine della colorazione si pone sulla sezione la soluzione di montaggio e il coprioggetto e si lasciano incubare a 37°C per 24 ore. Le sezioni che fungeranno da controllo positivo sono state incubate per 10' a 37°C con 1500U/ml DNase in 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA. Le sezioni sono state osservate utilizzando un microscopio ottico Leitz microscope ad un ingrandimento 200X.

### **3.3.3.2 Immunohistochimica**

L'analisi in immunohistochimica permette di rilevare l'espressione di determinati antigeni sulla superficie delle cellule mediante l'utilizzo di anticorpi. In questo caso l'analisi è stata condotta per valutare l'espressione del Ki67, un indice di proliferazione cellulare.

Per l'indagine immunohistochimica, le sezioni sono state sparaffinate, reidratate e trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% in metanolo per inattivare le perossidasi endogene. Dopo essere state lavate con Tris-buffered (TBS), le sezioni sono state processate utilizzando un sistema a microonde per il recupero dell'antigene utilizzando un buffer citrato (10 mM, pH 6) per 4 cicli ciascuno da 5'(750 W). Le sezioni sono quindi state incubate overnight a 4°C con l'anticorpo primario monoclonale Ki67 (Bio Genex) diluito 1:80. Il sistema En Vision monoclonal immunoenzymatic (Dako) è stato utilizzato per la lettura della reazione, sviluppata in 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA). Infine le sezioni sono state contrastate con ematossilina per 10'', deidratate e montate con Eukitt. Le sezioni non trattate con l'anticorpo primario sono state usate come controlli negativi e sezioni con carcinoma mammario umano sono state usate come controlli

positivi. Le sezioni sono state osservate utilizzando un microscopio ottico Leitz microscope ad un ingrandimento 200X.

### **3.3.4. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)**

A differenza dell'analisi con Microscopio Ottico, la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) permette una analisi ultrastrutturale delle cellule.

I campioni sono stati trattati secondo un protocollo d'inclusione lenta in resina epossidica. Le fasi che permettono la preparazione del campione sono le seguenti:

- **FISSAZIONE:** è la fase che permette di bloccare le funzioni cellulari, il metabolismo cellulare e i meccanismi degenerativi. Viene effettuata utilizzando aldeidi e tetrossido di osmio. Le aldeidi permettono di fissare la componente proteica evitando per cui che vi sia perdita della componente citoplasmatica. Per fissare la porzione lipidica, si usa il Tetrossido di Osmio: esso lega le teste apolari dei fosfolipidi di membrana e, essendo un elemento a numero atomico elevato, permette di vederle come nere.

In questo studio, per la fissazione delle cellule stromali (eseguita nella seconda parte dello studio), una volta eliminato il terreno di coltura ed effettuati dei lavaggi con PBS, è stata utilizzata paraformaldeide 4% in dH<sub>2</sub>O per 20' a temperatura ambiente. Le cellule sono state poi staccate dalla piastra mediante l'ausilio di uno scraper e raccolte in una provetta da 1,5 mL che è stata successivamente centrifugata a 2000 rpm per 5'. Il fissativo è stato quindi rimosso e sostituito con del fissativo fresco. Il tutto è stato posto a 4°C per 25 ore, trascorse le quali la paraformaldeide è stata eliminata mediante un lavaggio di 3-4 ore in tampone fosfato 0.15 M a temperatura ambiente.

A questo punto, è stata aggiunta una soluzione di Tetrossido di Osmio (*Electron Microscopy*) 1% in tampone fosfato 0.2 M per 1 ora a temperatura ambiente.

- **DISIDRATAZIONE:** il processo di disidratazione avviene mediante sostituzione graduale dell'acqua nelle cellule, con alcool o acetone. In questo modo si evitano improvvise variazioni osmotiche che potrebbero danneggiare la cellula.

La disidratazione delle cellule stromali è stata effettuata mediante passaggi seriali in soluzioni a concentrazione crescente di etanolo:

- Etanolo 30% per 15'

- Etanolo 50% per 15'
- Etanolo 70% per 30'
- Etanolo 95% per 45' per 2 volte
- Etanolo 100% per 45' per 2 volte

Terminata la disidratazione, i campioni sono stati posti per 45' in ossido di propilene (*Electron Microscopy*), un solvente di transizione.

- **IMPREGNAZIONE:** per l'impregnazione è stata utilizzata la resina epossidica, un composto che polimerizza le cellule ma che non risulta reattivo nei confronti di esse.

La resina epossidica usata in questo studio è composta da Araldite HY (Araldite M, *Harneder Fluka, Buchs, Switzerland*) ed Araldite CY (Araldite M, *Harneder Fluka, Buchs, Switzerland*) in rapporto 1:1 a cui viene successivamente aggiunta Araldite DY (2,4,6 tridimetilaminometilfenolo, DMP30, *Hardener Fluka, Buchs, Switzerland*) per accelerare la reazione di polimerizzazione della resina.

Innanzitutto, è fondamentale sostituire gradualmente l'ossido di propilene con il mezzo d'inclusione. Per far ciò i campioni sono stati posti in soluzioni di resina ed epossido, a concentrazione crescente di resina:

- Ossido di propilene + resina (2:1) per 45' in stufa a 60°C
- Ossido di propilene + resina (1:2) per 60' in stufa a 60°C
- Over night in resina pura a temperatura ambiente.

- **INCLUSIONE:** i campioni sono stati inclusi in resina pura, e posti in stufa a 60°C per 72 ore per favorire la completa polimerizzazione della resina.
- **SEZIONAMENTO:** il sezionamento del campione è avvenuto in due fasi. In una prima fase, sono state realizzate, con lama di vetro, delle sezioni semifini (dello spessore di 1 µm) che sono poi state poste su un vetrino portaoggetti e colorate con Blu di Toluidina (*Bio-Optica s.p.a., Milan*). I campioni sono stati, quindi, osservati per identificare la zona d'interesse che, una volta individuata, è stata circoscritta eliminando con una lametta la resina in eccesso. A questo punto è stato eseguito un secondo sezionamento, mediante lama di diamante, per ottenere delle sezioni ultrafini (dello spessore di 60-70 nm). Quest'ultime sono state raccolte su apposite griglie di osservazione,

trattate con vapori di Xilolo per essere appiattite e coperte con una pellicola di plastica (Formvar).

- COLORAZIONE: la colorazione delle sezioni avviene con elementi a numero atomico elevato (metalli) che permettono di avere un contrasto sull'immagine.

A tale scopo, le sezioni sono state colorate con acetato uranile per 10' (che rende visibili gli acidi nucleici e le proteine) e per 5' con citrato di piombo (che fornisce un alto contrasto alle componenti tissutali).

L'osservazione è stata effettuata con Microscopio Elettronico a Trasmissione (*Philips 400T*).

### 3.4. Valutazione dell'effetto della NAC e dell'LH su tessuto ovarico trattato in vitro con doxorubicina (DOX) e cisplatino (CIS)

#### 3.4.1. Pazienti

Nello studio sono state utilizzate fettine di corticale ovarica, donate per ricerca, di 5 pazienti (*Tabella 2*) che si sono rivolte all'Unità Operativa per la crioconservazione di tessuto ovarico.

N°	PATOLOGIA	ETÀ	VIALS SCONGELATI	PESO (g)	DIMENSIONE
Paziente N1	Carcinoma mammario	29	1 ovaio destro	0.0327	14 mm x 2 mm
			1 ovaio sinistro	0.0463	15 mm x 3 mm
Paziente N2	Endometriosi quarto stadio	41	1 ovaio destro	0.0389	15 mm x 2 mm
			1 ovaio sinistro	0.0427	15 mm x 3 mm
Paziente N3	Carcinoma mammario	35	1 ovaio destro	0.0405	14 mm x 2 mm
			1 ovaio sinistro	0.0485	15 mm x 2 mm
Paziente N4	Carcinoma mammario	39	1 ovaio destro	0.0442	15 mm x 2 mm
			1 ovaio sinistro	0.0423	15 mm x 3 mm
Paziente N5	Carcinoma mammario	35	1 ovaio destro	0.0416	15 mm x 2 mm
			1 ovaio sinistro	0.0434	14 mm x 3 mm

*Tabella 2. Campioni scongelati per ogni paziente coinvolta nello studio*

#### 3.4.2. Isolamento e coltura di cellule stromali da tessuto ovarico congelato/scongelato

Al fine di isolare le cellule stromali dalle fettine di corticale ovarica scongelate, il tessuto è stato disgregato meccanicamente, con un bisturi, in piccoli frammenti e successivamente incubato per la digestione enzimatica in un terreno di dissociazione composto da:

- Collagenasi/Ialuronidasi (3000 U/mL Collagenase, 1000 U/mL Hyaluronidase (*Stemcell Technologies Milan, Italy*))
- Epicult b-basal medium (*Stemcell Technologies Milan, Italy*)

Studi precedenti effettuati dallo stesso laboratorio, utilizzando concentrazioni diverse di Collagenasi/Ialuronidasi, hanno dimostrato che la migliore disgregazione del tessuto corticale si ottiene con una concentrazione di 300 U/mL Collagenasi - 100U/mL Ialuronidasi.

I frammenti di corticale ovarica sono stati posti in una soluzione di dissociazione costituita da 500 µL di Collagenasi/Ialuronidasi e 4,5 di

EpiCult b-basal medium e collocati su un sistema rotante per 4 ore a 37°C e al 6% di CO<sub>2</sub>.

Terminata l'incubazione, i campioni nella miscela di disgregazione sono stati centrifugati a 200 g per 3' e il pellet, è stato posto in 5 mL di tripsina (*Sigma; Milan, Italy*) per 5' in modo da disgregare ulteriormente il tessuto.

Trascorsi i 5', 5 mL di HBBG (Hank's balanced salts solution, *Euro Clone*) sono stati aggiunti per bloccare l'attività dell'enzima e il tutto è stato ulteriormente centrifugato a 500 g per 5'.

Il pellet ottenuto, è stato risospeso in 1 mL di terreno di coltura composto da alfa-MEM supplementato con Sodio Piruvato (*Sigma, Milan, Italy*), Penicillina G (50 IU/mL)/Streptomicina (50 µg/mL- *Sigma, Milan, Italy*), 1% ITS (5 µg/ml Insulina, 5 µg/ml Transferrina, 5 ng/ml Selenite, *Sigma, Milan, Italy*) e 20% siero umano scomplementato come supporto proteico.

I sovranatanti, ricavati da entrambe le centrifugate, sono stati ulteriormente centrifugati per recuperare il maggior numero possibile di cellule.

Prima di procedere alla semina cellulare, è stata eseguita la conta di vitalità cellulare con Trypan Blue mediante camera di Burker. Sono state seminate circa 200.000 cellule per ogni pozzetto (piastre multiwell da 6 pozzetti diametro 35 mm) e tenute in incubatore a 37°C e al 6% di CO<sub>2</sub> per permettere alle cellule di attaccarsi al fondo del pozzetto e proliferare.

Le colture sono state monitorate per 28 giorni, effettuando ogni 48 ore una sostituzione del 50% del terreno di coltura con del terreno fresco. Le cellule sono state monitorate periodicamente, mediante Microscopio Ottico (*Nikon*), per valutare l'andamento della coltura.

Al terzo giorno di coltura, è stata eseguita una colorazione con Giemsa (*Sigma, Milan, Italy*), un colorante policromatico, che permette di distinguere le varie componenti cellulari colorando il nucleo in viola-magenta e il citoplasma con sfumature dall'azzurro al rosa.

Per effettuare la colorazione con Giemsa, è stato inizialmente rimosso il terreno di coltura, e il monostrato cellulare è stato lavato con del PBS 1X per 3' e poi fissato con etanolo per 10' a temperatura ambiente. Una volta eliminato il fissativo, sono stati aggiunti 2 mL di colorante per 10' a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, il colorante è stato rimosso e le cellule sono state osservate con Microscopio Ottico.

### **3.4.3. Valutazione della purezza della coltura di cellule stromali**

Per confermare che la coltura fosse costituita unicamente da cellule stromali, è stata valutata l'espressione della vimentina, proteina dei

filamenti intermedi espressa principalmente nelle cellule di origine mesenchimale, quali fibroblasti e cellule endoteliali.

La caratterizzazione è stata eseguita attraverso analisi in immunofluorescenza indiretta e confermata mediante RT-PCR.

#### **3.4.3.1. Immunofluorescenza indiretta**

L'analisi in immunofluorescenza permette di rilevare l'espressione di determinati antigeni sulla superficie delle cellule mediante l'utilizzo di anticorpi. Nell'immunofluorescenza indiretta, la reazione specifica antigene-anticorpo viene rilevata attraverso un secondo anticorpo, detto secondario, specifico per il primo e coniugato ad un fluorocromo.

Al fine di verificare la natura fibroblastoide delle cellule in coltura e contemporaneamente escludere la presenza di cellule epiteliali, siamo andati a valutare l'espressione di vimentina e citocheratina. L'analisi è stata effettuata dopo 15 e 28 giorni di coltura.

Cinquantamila cellule per paziente, sono state seminate su di un vetrino portaoggetto posto in un pozzetto di una piastra multiwell da 6 pozzetti, ed incubate a 37°C al 6% di CO<sub>2</sub>. Dopo 15 e 28 giorni di coltura, si è proceduto con il trattamento per l'analisi in immunofluorescenza.

Le cellule sono state fissate mediante l'aggiunta di 1,5 mL di paraformaldeide al 4% in dH<sub>2</sub>O a temperatura ambiente per 30', trascorsi i quali sono stati effettuati lavaggi per 3' a temperatura ambiente con PBS 1X per eliminare il fissativo.

Essendo la vimentina e la citocheratina delle proteine intracellulari, si è dovuto procedere con la permeabilizzazione della membrana cellulare mediante trattamento con una soluzione di PBS/Triton X-100 0.1% per 10'.

Per impedire il legame aspecifico degli anticorpi, le cellule sono state lavate 2-3 volte con PBS 1X per 3' e trattate con PBS/BSA 4% per 1 ora a temperatura ambiente.

Per valutare l'espressione di vimentina e citocheratina, sono stati mescolati in un'unica soluzione due anticorpi primari:

- Anticorpo Anti-vimentina (Rabbit/IgG; *ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA*);
- Anticorpo Anti-citocheratina (Mouse/IgG1; *ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA*).

Nello specifico, i vetrini sono stati incubati con una soluzione composta da 192 µl PBS/BSA + 4 µl di Anticorpo Anti-vimentina + 4 µl di Anticorpo Anti-citocheratina (diluizione 1:50) per 1 ora in camera umida.

Dopo aver effettuato due lavaggi con PBS 1X per 3' ciascuno, si è proceduto con l'incubazione con gli anticorpi secondari coniugati con:

- TRITC (Rhodamine-coniugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG. *Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA*). Assorbanza massima a 550 nm; Emissione massima a 570 nm;
- FITCH (Fluorescein-coniugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG. *Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA*) (Assorbanza massima a 492 nm; Emissione massima a 520 nm).

I vetrini sono stati quindi posti in una soluzione, contenente 297,6 µl di PBS/BSA + 1,2 µl di Anticorpo II coniugato con TRITC + 1,2 µl di Anticorpo II coniugato con FITCH (diluizione 1:250), overnight a 4°C in camera umida. Il giorno successivo sono stati effettuati due lavaggi in PBS 1X per 3' ciascuno, in seguito ai quali i vetrini sono stati montati su vetrino portaoggetto usando come montante una soluzione costituita da glicerolo e colorante Hoechst 33258 (*Sigma, Milan, Italy*). Questa soluzione è stata preparata sciogliendo 1 mg di colorante in 1 mL di acqua distillata e aggiungendo poi una soluzione di glicerolo e PBS (in rapporto 3:1), per raggiungere una concentrazione finale di colorante 2,5 µg/ml.

L'Hoechst 33258 è un fluoroforo che penetra nelle cellule e lega il DNA, in particolare timina e adenina, liberando un segnale fluorescente nel blu (ex/em 330-380 nm/420 nm), permette in questo modo di valutare l'integrità nucleare.

L'osservazione dei vetri è avvenuta mediante Microscopio a Fluorescenza (*Leica CTR6000, Leica Microsystems, Germany*).

#### **3.4.3.2. Reverse trascription-PCR (RT-PCR)**

La RT-PCR è una tecnica che permette di valutare l'espressione cellulare di uno specifico RNA. In questo studio, è stata condotta in cellule stromali ovariche a 15 e 28 giorni di coltura, al fine di verificare l'espressione della vimentina.

##### **- Estrazione dell'RNA**

L'estrazione dell'RNA dalle cellule è stata effettuata mediante TRIzol (*Invitrogen, Carlsbad, CA*), una soluzione che dissolve le componenti cellulari mantenendo contemporaneamente l'integrità della struttura dell'RNA.

Le cellule sono state tripsinizzate, contaminate mediante camera di Burker e centrifugate a 500 g per 5'; il pellet ottenuto è stato posto a contatto con il TRIzol (1 mL ogni 107 cellule) per 30'', trascorsi i quali sono stati aggiunti

0.2 mL di cloroformio (*Carlo Erba Reagents*) per ogni mL di TRIzol. I campioni sono, quindi, stati agitati energicamente per 15', e lasciati in ghiaccio per 5'. A questo punto è stata condotta un'ulteriore centrifugazione a 12000 g per 15' a 4°C ottenendo così due fasi: una fase acquosa in cui si trova l'RNA (sovrastante) ed una fase cloroformica in cui si trovano le proteine e il DNA. La fase acquosa è stata prelevata e trasferita in nuove provette da 1.5 ml poste in ghiaccio.

Le cellule sono state poi incubate con 1 µl di glicogeno (*Invitrogen* 100 µl, 20µg/µl) e 0.5 ml di alcol isopropilico (*Carlo Erba Reagents*) per ogni ml di TRIzol per 10' in ghiaccio, ed in seguito ulteriormente centrifugate a 12000 g per 15' a 4°C. Si ottiene così un pellet di RNA che è stato isolato, eliminando il surnatante, ed incubato con 1 mL di etanolo al 75% per ogni mL di TRIzol. Il tutto è stato nuovamente centrifugato a 12000 g per 10' a 4°C. Il sopranatante è stato eliminato e il pellet tenuto a temperatura ambiente in modo tale da far evaporare l'etanolo rimasto nella provetta. Una volta essiccato il pellet, sono stati aggiunti 11 µl di acqua DEPC, cioè acqua privata di RNasi grazie a trattamento con dietilpirocarbonato (*Invitrogen*). Le provette sono state, quindi, poste in bagno riscaldato a 65°C per 5'.

La quantità e qualità dell'RNA purificato è stata analizzata tramite NanoDrop Spectrophotometer (*Thermo Scientific*).

#### **- Retrotrascrizione a cDNA**

L'RNA estratto è stato retrotrascritto a DNA, ottenendo il cDNA (DNA complementare).

Per ottenere ciò, l'RNA è stato incubato con un enzima, la DNA polimerasi RNA-dipendente (o trascrittasi inversa), che ha lo scopo di trascrivere il DNA utilizzando come stampo l'RNA. Per fare ciò, la trascrittasi inversa, necessita di un innesco, cioè una catena di circa 20 residui di Timina (detta oligo-dT), complementare alla coda poli-A dell'mRNA da retrotrascrivere.

In questo studio l'RNA estratto è stato retrotrascritto utilizzando il sistema Master RT plus PCR (*Life Technologies*).

La prima fase prevede che, ad ogni campione, contenente circa 1µg di proteine DEPC per un volume totale di 10µL, siano aggiunti 2µL della MIX 1, cioè una soluzione composta da:

- 1µL di dNTP, composta da 10 mM di ogni base (*Invitrogen*);
- 1µL di oligo-dT 50µM (*Invitrogen*).

I campioni, con volume finale di 12 µL, sono stati quindi posti in un termociclatore (*MJ Research*) per 5' a 65°C, per permettere l'appaiamento degli oligo-dT (annealing).

Successivamente, ad ogni campione, sono stati aggiunti 8  $\mu$ L della MIX 2 costituita da:

- 4  $\mu$ L di 5X First Strand Buffer (*Invitrogen*);
- 2  $\mu$ L di DTT 0.1 M (Ditiotreitolo), additivo riducente stabilizzatore della retrotrascrittasi;
- 1  $\mu$ L di MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Reverse Transcriptase 40000 U, 200u/ $\mu$ L)(*Invitrogen*);
- 1  $\mu$ L di RNasi OUT (Recombinant Ribonuclease Inhibitor, 5000 U, 40 u/ $\mu$ L) (*Invitrogen*).

I campioni sono, quindi, stati riposizionati nel termociclatore per 65' a 37°C per permettere la retrotrascrizione. Al termine della reazione il cDNA è stato diluito con acqua distillata 1:4.

#### - Polymerase Chain Reaction (PCR)

Il cDNA ottenuto è stato amplificato mediante PCR. In generale, la reazione di PCR si compone di tre fasi ripetute per 30-35 cicli:

1. Denaturazione della doppia elica di DNA: si ottiene a 95°C per 1';
2. Annealing dei due primer, forward e reverse: si ottiene ad una temperatura calcolata a partire dalla temperatura di Melting e specifica per il tipo di primer usato;
3. Allungamento del nuovo filamento di DNA: avviene a 72°C grazie ad una polimerasi termoresistente.

Per ottenere l'allungamento, ciascun campione, contenente 4  $\mu$ L di cDNA, è stato posto in 21  $\mu$ L di una MIX composta da:

- 0,5  $\mu$ L di dNTP (10mM ogni base. *Invitrogen*);
- 0,75  $\mu$ L di MgCl<sub>2</sub> (50 mM, 1 ml. *Invitrogen*);
- 2,5  $\mu$ L di 10X PCR-MgCl<sub>2</sub> Buffer (1.25 ml. *Invitrogen*);
- 15  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O;
- 0,3  $\mu$ L di Taq Polimerasi (Taq DNA Polymerase Recombinant 500 U, 5u/ $\mu$ L. *Invitrogen*);
- 1  $\mu$ L di Primer forward + 1  $\mu$ L di Primer reverse (10X). I primer utilizzati sono stati:
  - Actina (200bp): Fw 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3'  
Rv 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA -3'
  - Vimentina (700bp): Fw 5'-TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT-3'  
Rv 5'-CCCTCACCTGTGAAGTGGAT- 3'.

Per ottenere l'amplificazione dei cDNA, i campioni così costituiti sono stati posti nel termociclatore in cui sono state impostate le fasi riportate in Tabella 3.

FASE	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (min.)
1	94	2
2	94	1
3	62	1
4	72	1
5	72	7

**Tabella 3.** Temperatura e durata delle fasi del termociclatore durante l'amplificazione del DNA

#### **- Corsa elettroforetica**

Alla fine dell'amplificazione, i frammenti sono stati separati mediante elettroforesi in gel d'agarosio all'1.8%.

Per ottenere ciò, sono stati aggiunti ad ogni campione 5 µL di Xilencianolo (6X), un tracciante colorato che permette di monitorare il processo di migrazione durante l'elettroforesi.

Per ogni pozzetto del gel, sono stati caricati 16 µl della miscela. Nel primo pozzetto è stato posto il marker 100bp (*Invitrogen*), nel secondo e nel terzo i campioni in cui è stata amplificata l'actina e nel quarto e quinto l'amplificato della vimentina.

La corsa elettroforetica è stata eseguita a 90 V per circa 30'. Al termine della corsa si è proceduto con l'analisi del gel mediante lettore Fluor-S Biorad.

#### **3.4.4 Trattamento delle cellule stromali ovariche con doxorubicina (DOX) e cisplatino (CIS)**

Per ognuno dei soggetti coinvolti nello studio, le cellule stromali, dopo 28 giorni di coltura, sono state tripsinizzate, contate e trattate per 24 ore con:

DOX (*Sigma*) 1 µM;

CIS (*Mayne Pharma Srl, Italy*) 10 µM;

Altre cellule non sono state trattate fungendo da controllo.

##### **3.4.4.1. Caratterizzazione morfologica delle cellule stromali**

Per ognuna delle pazienti coinvolte nello studio, una certa quantità di cellule stromali in coltura è stata sottoposta a valutazione delle caratteristiche morfologiche al fine di valutarne lo stato di preservazione.

La caratterizzazione morfologica è stata eseguita attraverso microscopia ottica e microscopia elettronica.

#### 3.4.4.2. Valutazione della vitalità cellulare

La vitalità delle cellule nelle diverse condizioni sperimentali è stata valutata mediante due saggi, il saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD e il saggio della sulforodamina B.

##### - Saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD

Il saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD (*Molecular Probes Invitrogen detection technologies*) è un test che permette di distinguere cellule vitali da cellule non vitali mediante l'utilizzo di due molecole fluorescenti: Acetossi Metil Calceina (Calceina-AM) ed Etidio Omodimero 1 (EthD-1).

La Calceina-AM è una sostanza idrofobica, non fluorescente, capace di attraversare la membrana plasmatica cellulare; una volta penetrata, le esterasi citoplasmatiche ne determinano la trasformazione a Calceina, un composto idrofilico fluorescente che viene trattenuto nel citoplasma e che produce una fluorescenza nel verde (ex/em ~495 nm/~515 nm).

L'EthD-1 penetra, invece, solo nelle cellule che presentano un danno alla membrana citoplasmatica e si lega agli acidi nucleici, producendo una fluorescenza nel rosso (ex/em ~495 nm/~635 nm). Pertanto, le cellule vitali, grazie alla loro attività esterasica intracellulare, avranno citoplasma colorato in verde; le cellule morte avranno invece nucleo colorato nel rosso.

Questa tecnica è veloce, sensibile e può essere usata per individuare gli eventi citotossici. Presenta, inoltre, una fluorescenza di fondo molto ridotta, in quanto, i coloranti utilizzati, non sono fluorescenti prima dell'interazione con le strutture cellulari.

Il saggio è stato eseguito su cellule non trattate (controllo) e cellule trattate con DOX e CIS. L'analisi è stata effettuata 24 ore dopo il trattamento.

A tale scopo, 40.000 cellule per condizione sperimentale, sono state seminate su vetrini portaoggetti precedentemente posti in pozzetti (diametro 22,1 mm) di una piastra multiwell da 12. Trascorse 24 ore dal trattamento, ciascun vetrino è stato ricoperto con una soluzione formata da:

- 10mL di PBS sterile;
- 20µL della soluzione stock di EthD-1 2mM;
- 5µl della soluzione stock di Calceina AM 4mM.

I vetrini sono, quindi, stati incubati con 2 mL di soluzione per 30' a temperatura ambiente, protetti dalla luce. Terminata l'incubazione, la soluzione di colorazione è stata eliminata e le cellule lavate con PBS 1X per 3'. Ogni vetro coprioggetto è stato poi montato su vetrino portaoggetto ed osservato con microscopio invertito attrezzato per la fluorescenza (*Leica CTR6000, Leica Microsystems, Germany*).

#### **- Saggio della sulforodamina B (SRB)**

Il saggio della sulforodamina B è un test colorimetrico che si basa sulla capacità di un colorante (la SRB) di legare i residui basici delle proteine. La quantità di colorante stesso, rilevabile mediante lettura allo spettrofotometro, sarà direttamente proporzionale alla quantità di cellule vive presenti nel pozzetto analizzato.

La valutazione della vitalità cellulare, mediante saggio della sulforodamina B, è stato eseguito su cellule non trattate (controllo) e cellule trattate con DOX, CIS, LH e combinazione di LH e chemioterapici. L'analisi è stata eseguita in triplo, sia dopo 24 ore dal trattamento, sia dopo 72 ore.

In ogni pozzetto sono state seminate circa 10.000 cellule in 100µL di medium di coltura.

Trascorse 24/72 ore, il terreno di coltura nei pozzetti è stato rimosso e, dopo aver effettuato due lavaggi con PBS 1X, le cellule sono state fissate utilizzando 50 µL/pozzetto di etanolo al 96% per 30 minuti.

Terminati i 30 minuti, sono stati effettuati 3 lavaggi con acqua distillata, e successivamente aggiunti 50 µL per pozzetto di sulforodamina B (*Sigma, Milan, Italy*) allo 0.4% in acido acetico 1% per 30 minuti a temperatura ambiente.

Ogni pozzetto è stato, quindi, lavato con 50µL di acido acetico 1%, fino ad ottenere la totale rimozione del colorante non legato alle cellule. Infine, il colorante è stato solubilizzato in 200µL per pozzetto di Tris 10 mM per 5'. La lettura dell'assorbanza di ogni pozzetto è stata eseguita a 570 nm mediante spettrofotometro (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*).

#### **3.4.4.3. Western blot**

Dopo 24 ore di trattamento con DOX e CIS sono stati valutati i seguenti markers attraverso Western blot:

- processi apoptotici mediante i markers Bax/Bcl2, PARP1, caspase-9;
- processi di proliferazione e differenziamento mediante i markers Akt1 e MAPK/ERK1/2;
- l'espressione del recettore per LH (LHR).

In pozzetti di una piastra multiwell da 6, sono state seminate 300.000 cellule/pozzetto in 2 mL di terreno di coltura contenente le varie sostanze da testare alle concentrazioni indicate precedentemente.

Trascorse 24 ore dal trattamento, le cellule sono state lisate per l'analisi al Western Blot. Innanzitutto, sono stati effettuati due lavaggi con PBS, in seguito ai quali le cellule sono state distaccate dal pozzetto e raccolte in

provette. Dopo centrifugazione a 400 g per 10', il pellet ottenuto è stato solubilizzato mediante un buffer di lisi cellulare (20 mM Tris-HCL, pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 5 µM NA<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) contenente inibitori delle proteasi (40 µg/mL aprotinina, 40 µg/mL leupeptina e 1 mM di PMSF) e tenuto in ghiaccio per 30'.

Trascorso il periodo d'incubazione, il tutto è stata eseguita una ulteriore centrifuga a 13200 g per 15'. Il surnatante, contenente il lisato proteico, è stato isolato e posto in un tampone di caricamento contenente mercaptoetanolo (riduce i ponti disolfuro permettendo una migliore denaturazione del campione) e blu di bromofenolo (per monitorare il processo di elettroforesi).

Il lisato così trattato, è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di poliacrilamide con SDS (SDS-PAGE) al 10% di acrilamide in buffer contenente SDS (pH 8,5) a 20 mA per gel.

Terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato posto in un apposito apparato (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) contenente tampone di trasferimento costituito da metanolo (pH 8,5), a 300 mA per 1h e 30' per permettere il trasferimento delle proteine sulla membrana (Hybond TM-C Extra, *Amersham, UK*). Terminato il blottaggio, la membrana è stata posta per 2h in 10 mL di una soluzione di blocco costituita da TBS (Tris Buffer Saline: 4,42% Tris-HCL, 8% NaCl a pH 7,4) contenente Tween 20 allo 0,1% e BSA al 5%.

A questo punto, è stata analizzata l'espressione di diverse proteine mediante l'aggiunta di 3 mL di TBS-BSA contenente l'anticorpo primario:

- Anticorpo monoclonale Anti-Bcl2 (Trevigen);
- Anticorpo monoclonale Anti-Bax (Trevigen);
- Anticorpo monoclonale Anti-PARP1 (Santa Cruz Biotechnology);
- Anticorpo monoclonale Anti-caspasi9 (Sigma-Aldrich);
- Anticorpo monoclonale Anti-Akt1 (Cell Signaling);
- Anticorpo monoclonale Anti- MAPK/ERK1/2 (Cell Signaling);
- Anticorpo policlonale Anti-LHCGR (Santa Cruz Biotechnology);
- Anticorpo policlonale Anti-Actina (Sigma-Aldrich).

L'incubazione con gli anticorpi primari è stata condotta overnight a 4°C.

Dopo due lavaggi in TBS da 15', è stata eseguita una seconda incubazione di 1h e 30', a temperatura ambiente, con anticorpo secondario coniugato con CY5 (fluorescenza nel verde; diluizione 1:1000).

Sono state a questo punto osservate le bande corrispondenti alle proteine in analisi con lo Scanner-laser (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*).

È stata, inoltre, eseguita, attraverso il programma Quantite one, un'analisi densitometrica delle bande ottenute.

### **3.4.5. Trattamento delle cellule stromali ovariche con DOX/CIS e N-Acetilcisteina (NAC) / ormone luteinizzante (LH)**

Per ognuno dei soggetti coinvolti nello studio, le cellule stromali, dopo 28 giorni di coltura, sono state tripsinizzate, contate e trattate per 24 ore con:

NAC (*Sigma*) 25 mmol/l;

LH (*Luveris* 75 IU/mL, *Merck Serono*) 200 mIU/mL;

DOX 1  $\mu$ M + NAC 25 mmol/L;

CIS 10  $\mu$ M + NAC 25 mmol/L;

DOX 1  $\mu$ M + LH 200 mIU/mL;

CIS 10  $\mu$ M + LH 200 mIU/mL.

Altre cellule non sono state trattate fungendo da controllo. Sulle cellule trattate con DOX + NAC e CIS + NAC sono state eseguite indagini di espressione per valutare i markers di infiammazione cellulare (mediante Real-time PCR). Sulle cellule trattate con DOX + LH e CIS + LH è stato eseguito un saggio di vitalità cellulare (sulfurodammina B).

#### **3.4.5.1 Real Time PCR**

I campioni nelle varie condizioni sperimentali sono stati sottoposti alla procedura di estrazione dell'RNA, come precedentemente descritto. Gli RNA totali estratti (2  $\mu$ g per condizione sperimentale), dopo purificazione con DNase Inactivation Reagent, sono stati retrotrascritti in DNA complementare (cDNA). I cDNA sono stati retrotrascritti, almeno 1  $\mu$ l (40 ng/ $\mu$ l cDNA), e amplificati con i primer specifici forward e reverse, entrambi alla concentrazione finale di 250 nM, in H<sub>2</sub>O RNasi-free e con la SYBR Green Supermix (*Biorad*) 1x. Ogni singolo ciclo di amplificazione si articola in 3 fasi: un primo step di denaturazione della doppia elica di DNA a 95°C per 30 sec, la seconda fase è caratterizzata dall'appaiamento dei primers specifici (annealing) per la porzione da amplificare secondo un regime termico strettamente dipendente dal primer utilizzato (55°C per 20 sec), e la terza fase di estensione per 30 sec a 72 °C.

I primer specifici sono stati disegnati tramite il programma Beacon Designer 2.0 (*Premier Biosoft*) e ottenuti dalla Sigma-Genosis (USA):

-COX-2 forward: 5'-CCTGTGCCTGATGAATTGC-3'; Tm: 54.8 °C;

-COX-2 reverse: 5'-CTGATGCGTGAAGTGCTG-3'; Tm: 55.1°C;

-IL-6 forward: 5'-CTGAAGGACACACTAAAGAAGATG-3'; Tm:55.2;

-IL-6 reverse:5'-GGAAACGAGCACGGAAGG-3'; Tm:55.2;

-IL8 forward 5'-GCTTTCTGATGGAAGAGAGC-3': Tm: 55.1°C

-IL8 reverse 5'GGCACAGTGGAACAAGGACT-3': Tm: 55.3°C

Come controllo, sono stati utilizzati i primer dell'Actina. La quantificazione dei trascritti e l'analisi dei dati è effettuata mediante il termocicizzatore IQCycler (Bio-rad).

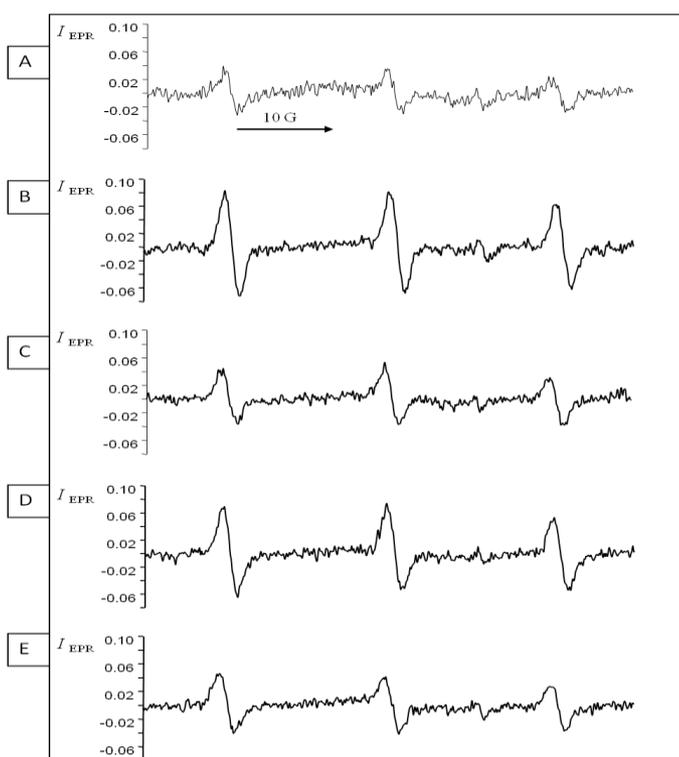
## 4. RISULTATI

### 4.1 Valutazione dell'effetto antiossidante della NAC sul tessuto ovarico sottoposto alla procedura di crioconservazione

#### 4.1.1. Spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica (EPR)

I livelli delle specie radicaliche reattive (SRR) nel tessuto ovarico fresco (t0) sono risultati di  $9.72 \pm 2.10 \mu\text{mol/g}$  (Fig 9A). La misurazione dei livelli di SRR nel campione crioconservato con il protocollo di congelamento standard (t1) sono risultati 2.5 volte più alti rispetto ai valori osservati nei campioni t0 ( $t1 \ 24.30 \pm 7.92$  vs.  $t0 \ 9.72 \pm 2.10 \ \mu\text{mol/g}$ ,  $P < 0.003$ , Fig 9B). Nei campioni crioconservati in presenza di NAC, i livelli di SRR sono risultati significativamente ridotti, anche se più alti rispetto a quelli osservati nei campioni t0 ( $t1 \ \text{NAC} \ 14.76 \pm 4.40 \ \mu\text{mol/g}$  vs.  $t0 \ 9.72 \pm 2.10$ ,  $P < 0.003$ , Fig 9C). I livelli di SRR dopo scongelamento e mantenimento del tessuto a  $4^\circ\text{C}$  per 2 ore sono risultati 2 volte più alti rispetto a quelli dei campioni t0 ( $t2 \ 20.46 \pm 5.33$  vs.  $t0 \ 9.72 \pm 2.10 \ \mu\text{mol/g}$ ,  $P < 0.003$ , Fig 9D); l'aggiunta di NAC ha determinato una riduzione dei livelli di SRR ( $t2 \ \text{NAC}$ ,  $14.82 \pm 2.83 \ \mu\text{mol/g}$ , vs.  $t0 \ 9.72 \pm 2.10$ ,  $P < 0.003$ , Fig 9E).

L'aggiunta di NAC ha determinato una riduzione dello stress ossidativo generato nel tessuto ovarico in seguito alla procedura di crioconservazione, sebbene tali valori non hanno raggiunto quelli basali osservati nei campioni t0.



**Fig 9.** Spettri EPR dei radicali nitrossido osservati al tempo t0 (A), t1 (B), t1 NAC (C), t2 (D) and t2 NAC (E).

#### **4.1.2. Microscopia ottica: Istologia, Tunel assay e Immunoistochimica**

Nei campioni di tessuto ovarico, freschi e crioconservati, sono stati osservati 1320 follicoli, dei quali la maggior parte era rappresentata da follicoli resting (freschi: 98.3% vs. crioconservati: 98.7%), mentre i rimanenti erano follicoli growing (1.7% vs. 1.3%). I follicoli sono risultati omogeneamente distribuiti in tutti i campioni e la densità follicolare non differiva nelle varie condizioni sperimentali (P=NS).

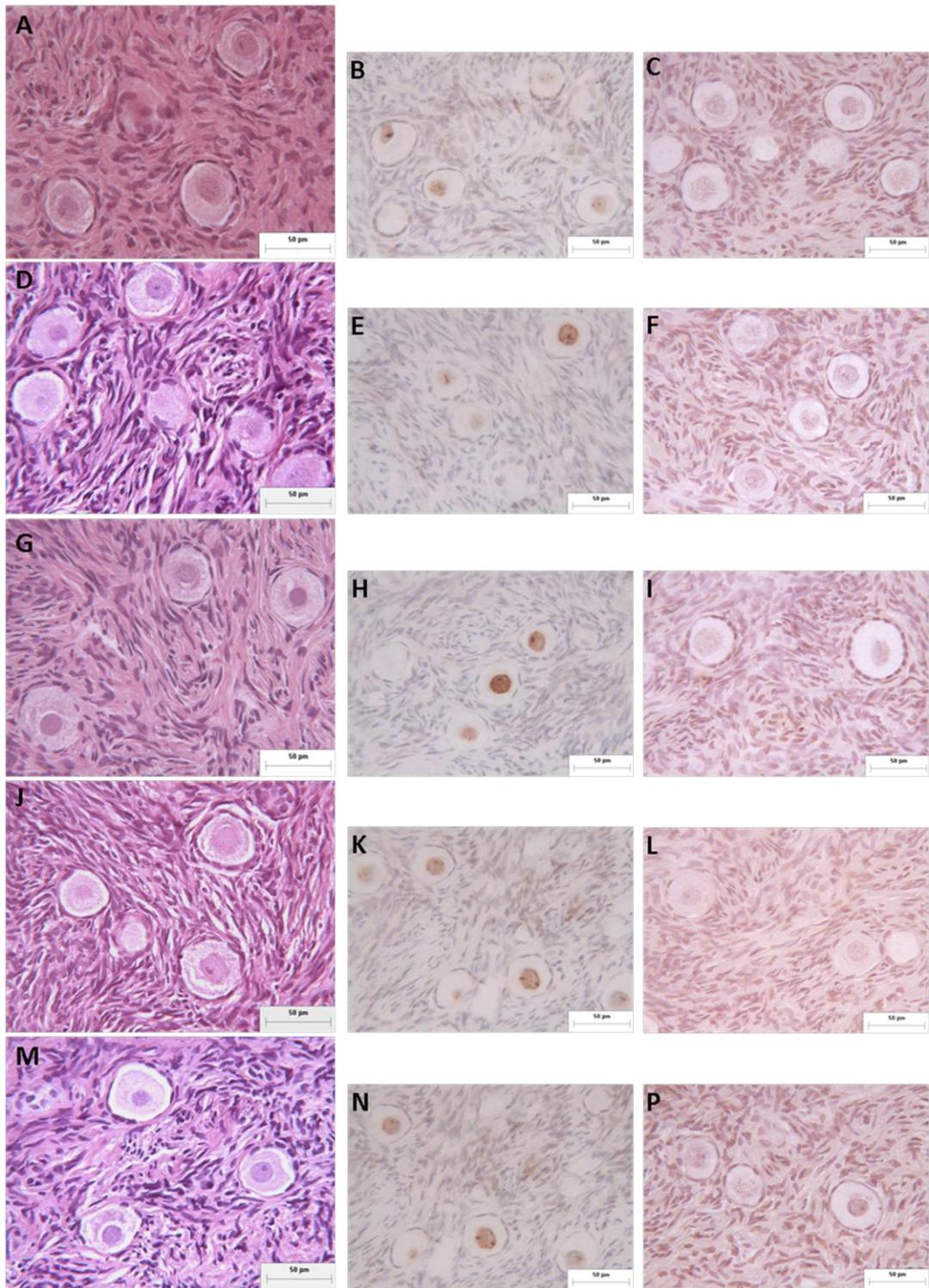
L'analisi in microscopia ottica dei campioni freschi (t0, *Fig 10A*) ha mostrato ovociti ben preservati con nuclei eucromatinici rotondeggianti e aggregati mitocondriali a livello perinucleare. Le cellule della granulosa e le cellule stromali hanno mostrato una normale morfologia, nuclei privi di addensamenti cromatinici e un leggero edema interstiziale stromale.

I campioni crioconservati in assenza di NAC (t1, *Fig 10B*), comparati ai campioni freschi (t0, *Fig 10A*), hanno mostrato ovociti con citoplasma svuotato e cellule della granulosa con addensamento cromatinico, edema interstiziale e addensamento cromatinico a livello stromale. Dopo 2 ore di mantenimento a 4°C (t2, *Fig 10D*), la morfologia dei campioni è risultata simile a quella osservata nei campioni t1.

Al contrario, i campioni crioconservati in presenza di NAC (t1 NAC, *Fig 10I*) hanno mantenuto caratteristiche di buona preservazione follicolare e stromale, assimilabile ai campioni t0. I campioni crioconservati e mantenuti in presenza di NAC (t2 NAC, *Fig 10E*) hanno presentato morfologia simile a quella osservata nei campioni t1 NAC.

L'indice apoptotico osservato nei campioni t1 e t2 (*Fig 10F e 10L*) è risultato leggermente aumentato rispetto ai campioni freschi t0 (*Fig 10C*), mentre nei campioni t1 NAC e t2 NAC (*Fig 10I e 10P*) è risultato equivalente ai campioni freschi t0. In particolare, le percentuali di apoptosi osservate nelle cellule della granulosa e nelle cellule stromali sono risultate pari a 11% e 10% in t0, 15% e 19% in t1, 12% e 15% in t1 NAC, 15% e 18% in t2, 13% e 15% in t2 NAC.

Riguardo l'indice di proliferazione cellulare, non si sono evidenziate differenze significative nei follicoli e nello stroma in tutte le condizioni sperimentali (*Fig 10B,E,H,K,N*).



**Fig 10.** *Analisi istologica, immunoistochimica ( Ki67) e TUNEL del tessuto ovarico al tempo t0 (A, B, C), t1 (D, E, F), t1 NAC (G, H, I), t2 (J, K, L) e t2 NAC (M, N, P). A, D, G, J, M: Magnification 25X; Bar=25µm. B, C, E, F, H, I, K, L, N, P: Magnification 25X; Bar=50µm.*

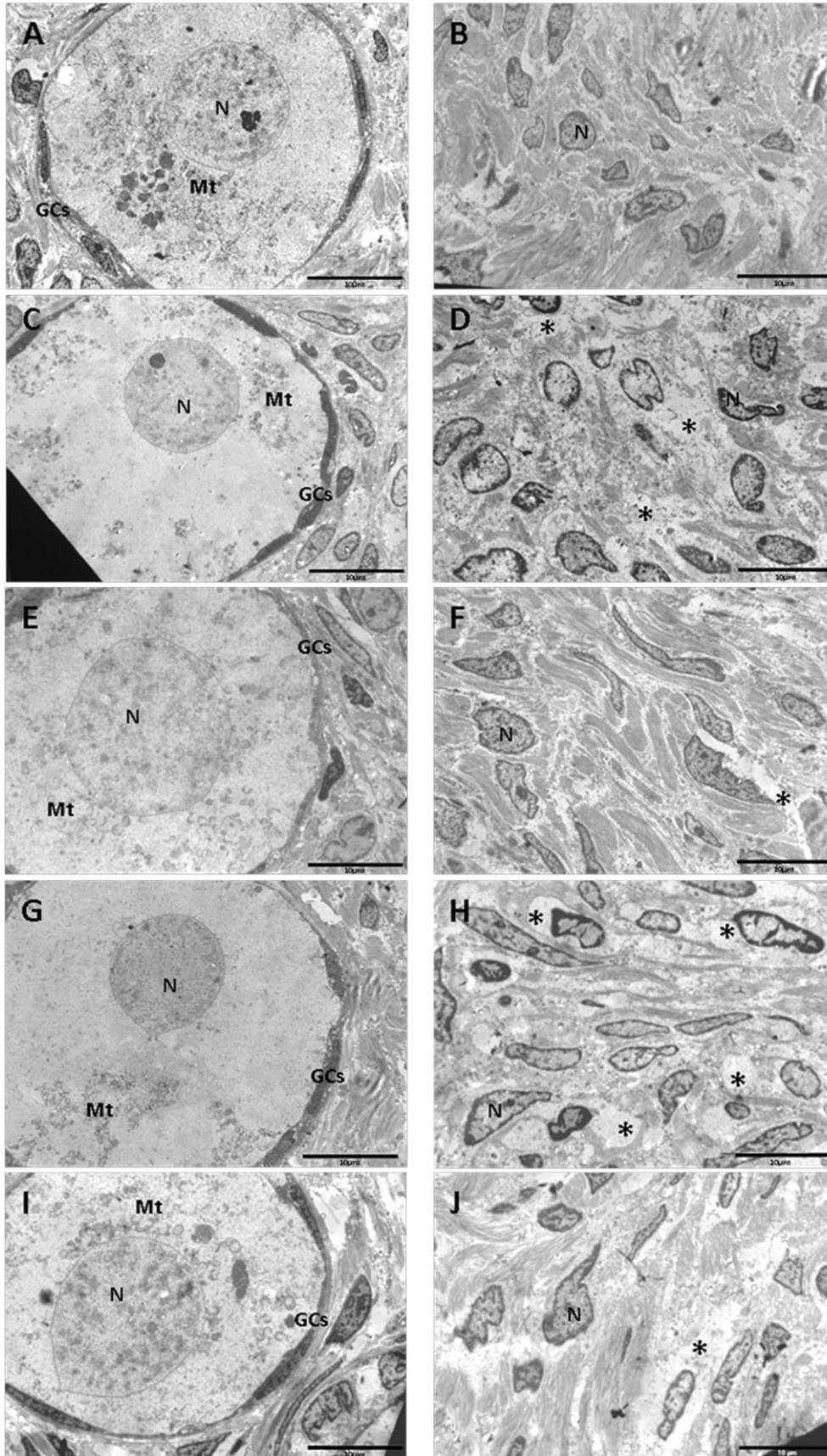
### **4.1.3. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)**

I campioni analizzati in microscopia ottica sono stati analizzati dal punto di vista ultrastrutturale, per meglio valutare l'effetto dell'aggiunta di NAC alle soluzioni di congelamento. L'analisi ultrastrutturale ha confermato la migliore preservazione stromale e follicolare dei campioni crioconservati in preservazione di NAC (*Fig 11A-J*).

L'osservazione dei campioni freschi (t0), nella maggior parte dei casi, ha evidenziato cellule della granulosa (GCs) ben adese all'ovocita; ovociti con nuclei (N) ampi e regolari con cromatina finemente dispersa e pori nucleari; citoplasma ricco in mitocondri (Mt) ovali o rotondeggianti con isolate creste lamellari a prevalente disposizione perinucleare; apparato del Golgi ben sviluppato; scarsi profili di reticolo endoplasmatico rugoso e occasionali inclusioni lipidiche. Le cellule fusate dello stroma hanno mostrato cromatina moderatamente dispersa (N), citoplasma chiaro, nessun segno di vacuolizzazione ed edema.

I campioni crioconservati in assenza di NAC (t1 e t2) hanno mostrato cellule della granulosa (GCs) con una tendenza alla perdita di coesione dagli elementi circostanti e qualche vacuolo; nuclei (N) degli ovociti con alterato disegno cromatinico e vacuolizzazione del citoplasma; mitocondri (Mt) e apparato del Golgi inalterati. Le cellule stromali hanno mostrato cromatina moderatamente addensata, citoplasma chiaro con vacuolizzazione (\*).

I campioni crioconservati in presenza di NAC (t1 NAC e t2 NAC) hanno mostrato caratteristiche morfologiche paragonabili a quelle osservate nei campioni freschi (t0): cellule della granulosa (GCs) coese all'ovocita; nucleo (N) degli ovociti con cromatina finemente dispersa; mitocondri (Mt) in numero, forma, dimensioni e posizione sovrapponibili al preparato fresco, con una modesta chiarificazione della matrice; apparato del Golgi ben strutturato e citoplasma con una tessitura omogenea e priva di granulazioni o vacuolizzazioni. Le cellule dello stroma hanno mostrato cromatina moderatamente dispersa (N), citoplasma omogeneo e chiaro, un leggero grado di edema interstiziale (\*) e assenza di vacuolizzazioni.



*Fig 11. Microscopia elettronica a trasmissione di follicoli e stroma al tempo t0 (A,B), t1 (C,D), t1 NAC (E,F), t2 (G,H) e t2 NAC (I, J). Magnification 1950X; Bar=10µm.*

## **4.2. Valutazione dell'effetto della NAC e dell'LH su tessuto ovarico trattato in vitro con doxorubicina (DOX) e cisplatino (CIS)**

### **4.2.1. Caratterizzazione morfologica delle cellule stromali**

La colorazione mediante colorante Giemsa ha permesso di osservare le caratteristiche morfologiche delle cellule in coltura (*Fig 12A*): forma eterogenea (fusata o poliedrica), nucleo di grandi dimensioni con evidenti nucleoli, proprietà comunemente descritte per definire cellule di natura mesenchimale in vitro.

Le cellule in coltura hanno mostrato un'organizzazione in cluster di cellule caratterizzate da lunghe protrusioni citoplasmatiche (*Fig 12B*), che consentono la comunicazione cellulare.

L'analisi ultrastrutturale con TEM ha confermato l'osservazione morfologica: le cellule presentavano un grande nucleo eucromatinico (N) con una sottile rima eterocromatinica in periferia e frequenti invaginazioni della membrana nucleare. A livello citoplasmatico è stata osservata la presenza di molti ribosomi e del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) caratterizzato da cisterne con contenuto granulare. Tra le cisterne del RER sono stati osservati molti mitocondri (M) caratterizzati da matrice densa e creste ben definite (*Fig 12C*). L'osservazione al TEM ha inoltre evidenziato la buona preservazione delle componenti, nucleare e citoplasmatica, delle cellule in coltura.

### **4.2.2. Purezza della coltura di cellule stromali**

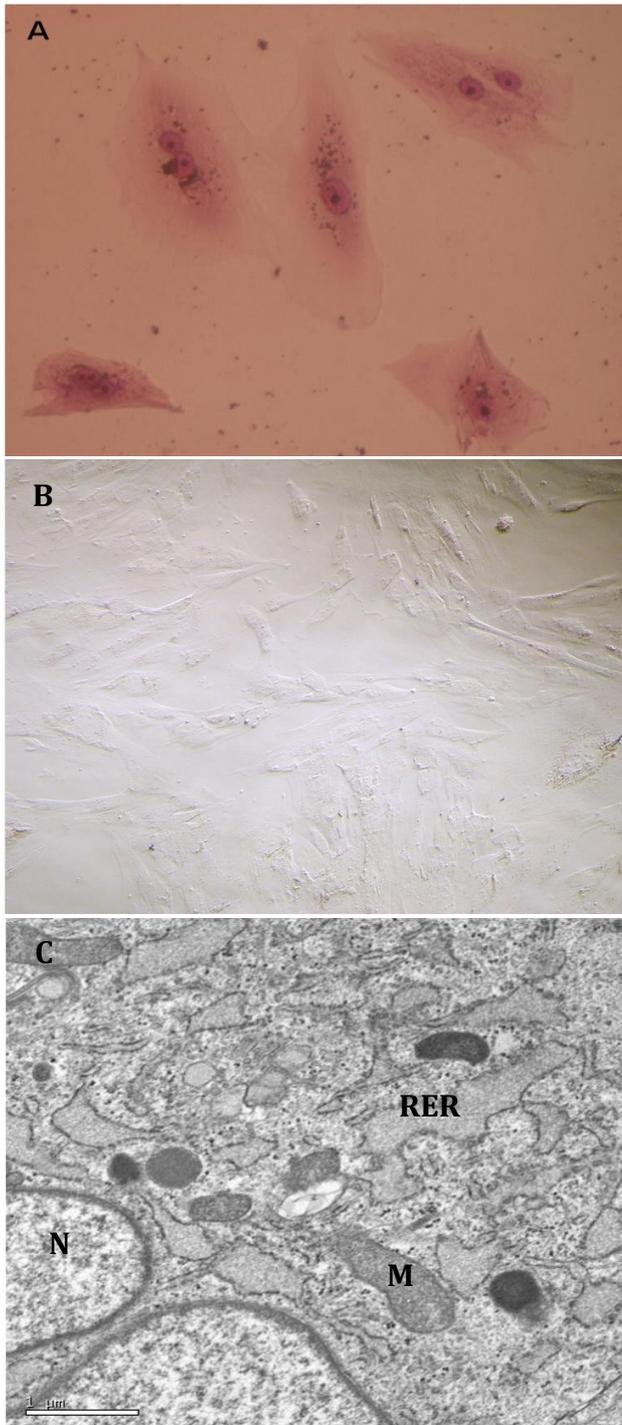
Le fettine di corticale ovarica crioconservate sono state scongelate e digerite enzimaticamente ottenendo una buona disgregazione del tessuto ed il recupero di circa 2.000.000 cellule per fettina di corticale.

Per confermare che la coltura fosse costituita unicamente da cellule stromali, è stata valutata l'espressione della vimentina (marcatore specifico delle cellule mesenchimali) sia attraverso immunofluorescenza sia mediante RT-PCR.

Mediante immunofluorescenza, dopo 15 e 28 giorni di coltura, è stato possibile dimostrare che tutte le cellule adese presentavano positività citoplasmatica per la vimentina, indicata dalla colorazione rossa delle cellule (*Fig 13B, Fig 14B*). Contemporaneamente è stata indagata anche l'espressione della citocheratina, un marcatore specifico delle cellule epiteliali, potenzialmente presenti nel tessuto ovarico crioconservato. Non è

stata rilevata positività citoplasmatica per questa proteina (nessuna cellula verde) confermando la purezza della coltura (*Fig 13C, Fig 14C*).

Tali risultati sono stati confermati dall'analisi molecolare mediante RT-PCR effettuata sulle cellule a 15 e 28 giorni di coltura. L'espressione della vimentina è indicata dalla banda in posizione specifica. L'actina è stata utilizzata come controllo interno (*Fig 15*).

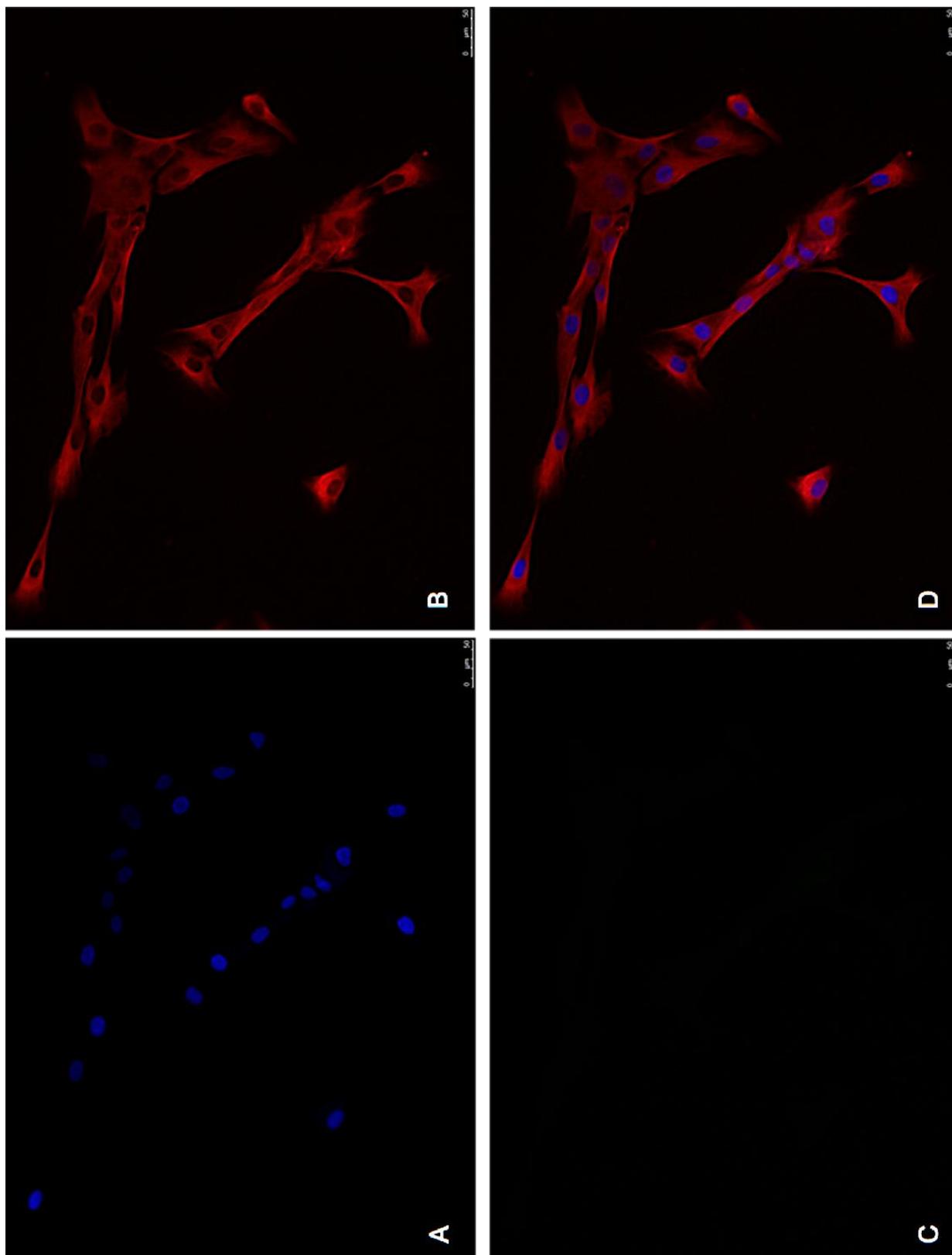


**Fig 12.** *Microscopia ottica:*

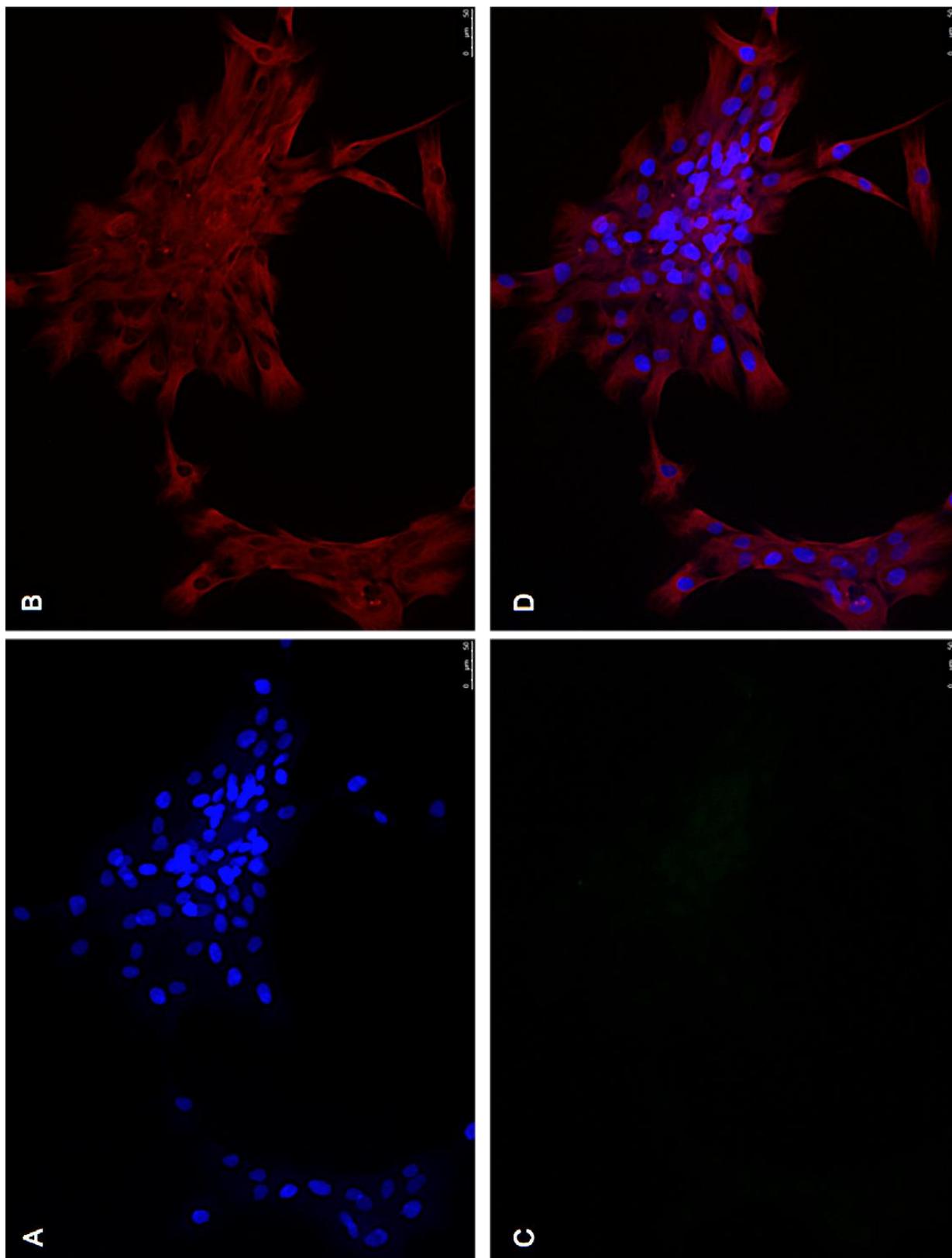
(A) *Colorazione Giemsa, 20X; (B) Cellule osservate in contrasto di fase, 10X.*

*Microscopia elettronica a*

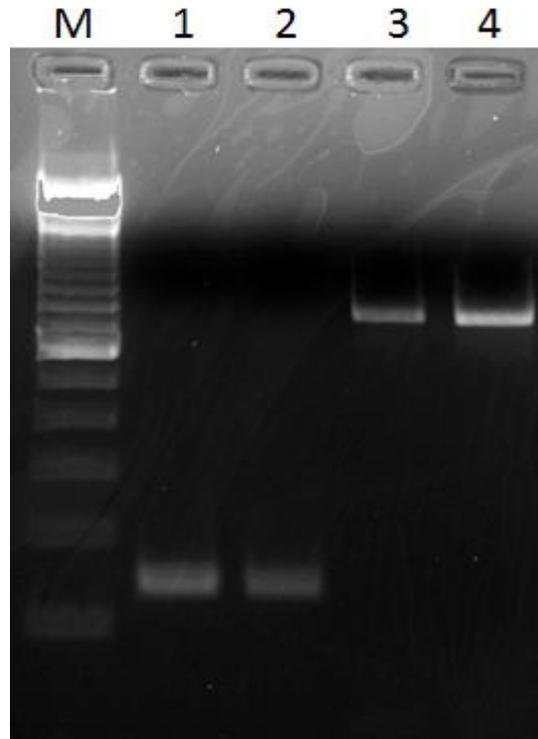
*trasmissione: (C) N = nucleo; RER = reticolo endoplasmatico rugoso; M = Mitocondrio. Barra = 1 μm*



**Fig 13.** *Immunofluorescenza indiretta. Cellule a 15 giorni di coltura. (A) Nuclei rilevati con Hoechst 33258 (blu), 10X; (B) cellule evidenziate con anticorpo anti-vimentina (rosso), 10X; (C) cellule evidenziate con anticorpo anti-citocheratina (verde), 10X; (D) merge colorazioni, 10X. Barra = 50 µm*



**Fig 14.** *Immunofluorescenza indiretta. Cellule a 28 giorni di coltura. (A) Nuclei rilevati con Hoechst 33258 (blu), 10X; (B) cellule evidenziate con anticorpo anti-vimentina (rosso), 10X; (C) cellule evidenziate con anticorpo anti-citocheratina (verde), 10X; (D) merge delle colorazioni, 10X. Barra = 50 µm*



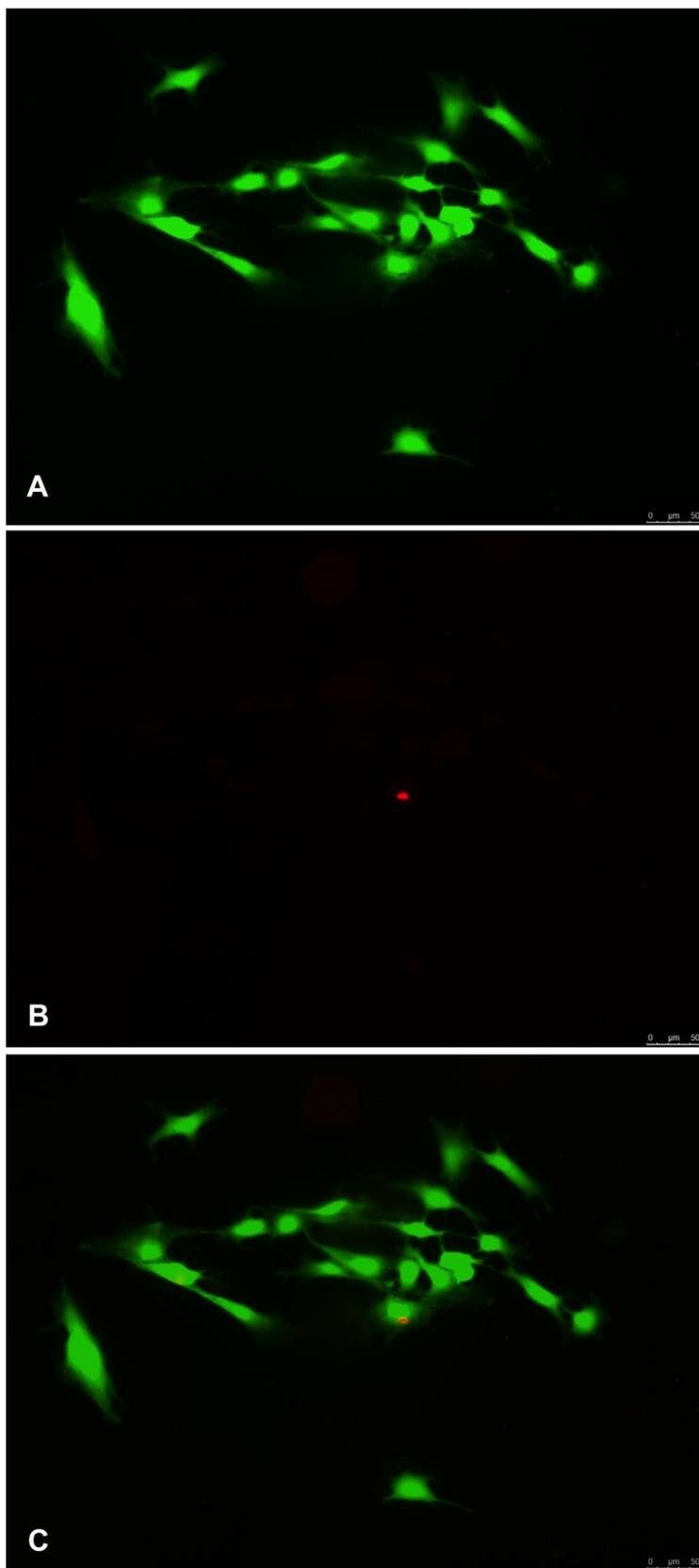
**Fig 15.** *Espressione dell'mRNA di Actina (1-2) e Vimentina (3-4) nelle cellule stromali a 15 (1-3) e 28 (2-4) giorni di coltura. M = 100 bp*

#### **4.2.3. Trattamento delle cellule stromali ovariche con doxorubicina (DOX) e cisplatino (CIS)**

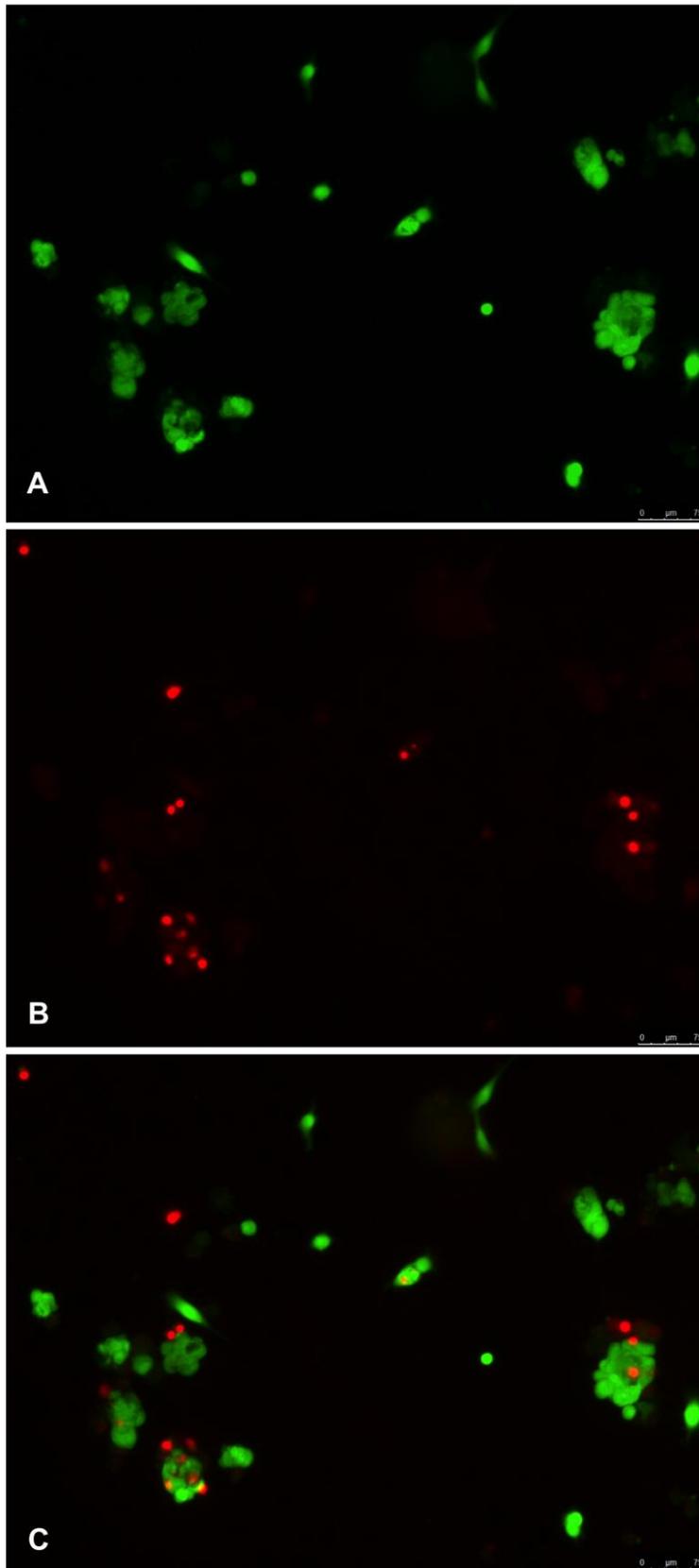
##### **4.2.3.1. Saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD**

In primo luogo è stata valutata la vitalità cellulare in assenza/presenza di trattamento chemioterapico mediante saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD.

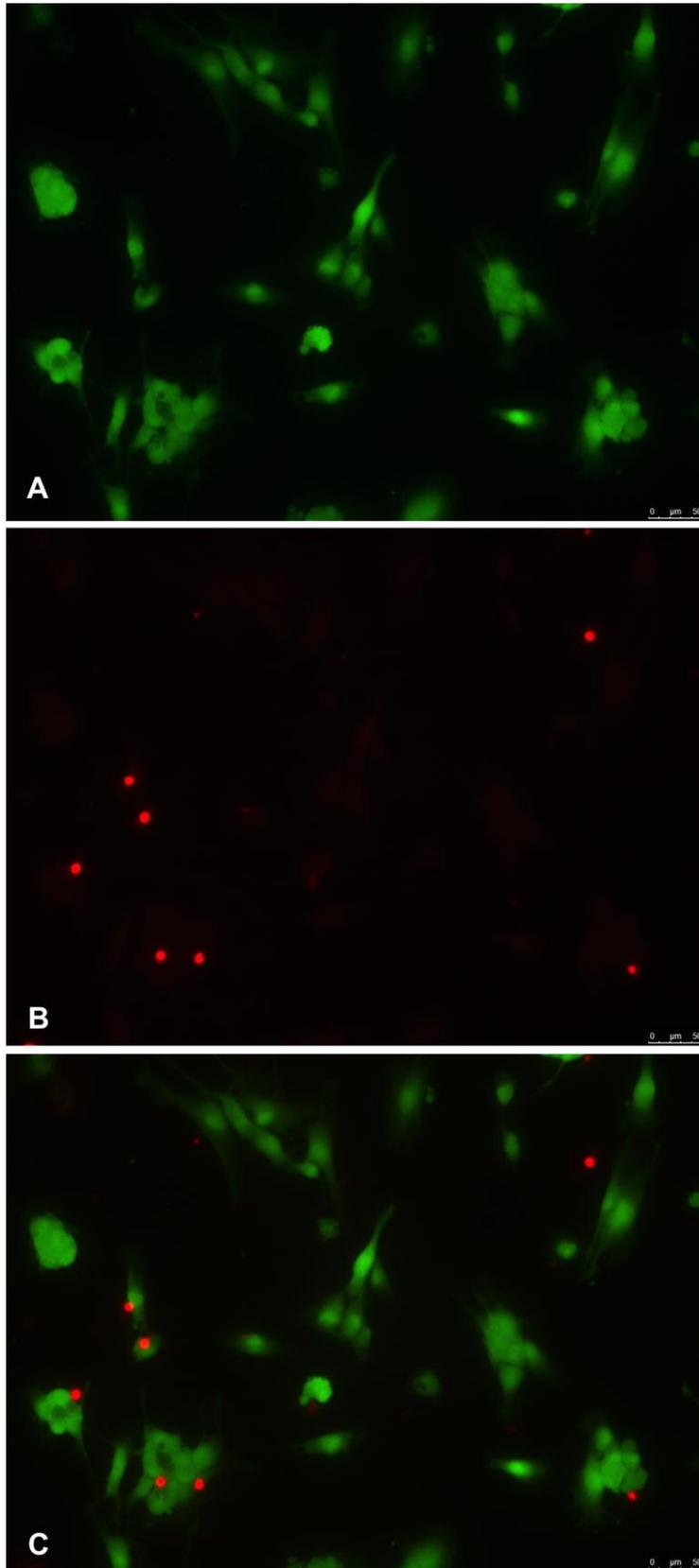
In assenza di trattamento (controllo - CTR) è stata osservata un'intensa colorazione citoplasmatica per la calceina nel 99% delle cellule (*Fig 16A-B-C*). Al contrario, dopo i trattamenti per 24 ore, è stato osservato un aumento della mortalità sia per le cellule trattate con DOX ( $27\% \pm 2.8$ ;  $p < 0.05$ ; *Fig 17 A-B-C*) che per le cellule trattate con CIS ( $19\% \pm 2.1$ ;  $p < 0.05$ ; *Fig 18A-B-C*), indicato dalla presenza di cellule positive, a livello nucleare, per EthD-1.



**Fig 16.** Saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD. Cellule non trattate. (A) Cellule vitali evidenziate con calceina, 10X; (B) Cellule morte evidenziate con EthD-1, 10X; (C) merge delle tre colorazioni, 10X. Barra = 50 µm



**Fig 17.** Saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD. Cellule trattate con DOX. (A) Cellule vitali evidenziate con calceina, 10X; (B) Cellule morte evidenziate con EthD-1, 10X; (C) merge delle tre colorazioni, 10X. Barra = 50  $\mu\text{m}$



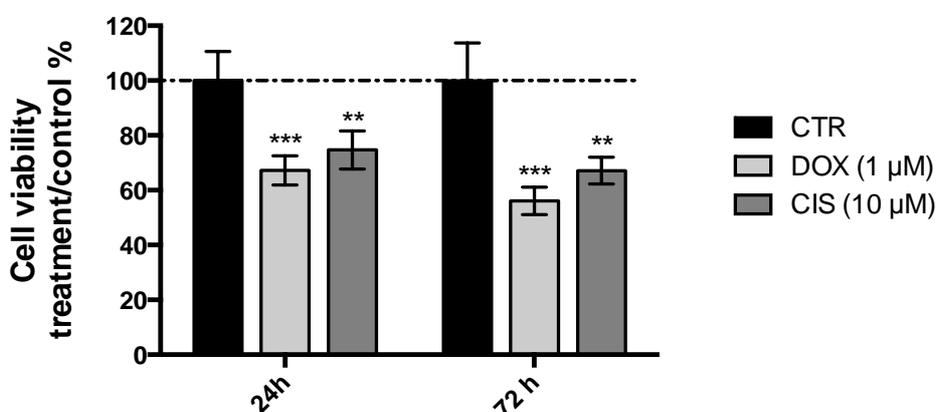
**Fig 18.** Saggio di vitalità/citotossicità LIVE/DEAD. Cellule trattate con CIS. (A) Cellule vitali evidenziate con calceina, 10X; (B) Cellule morte evidenziate con EthD-1, 10X; (C) merge delle tre colorazioni, 10X. Barra = 50 µm

#### 4.2.3.2. Saggio della sulforodamina B (SRB)

È stata valutata la vitalità cellulare in assenza/presenza di trattamento chemioterapico, per 24 e 72 ore, mediante saggio SRB.

Dopo trattamento con DOX e con CIS, è stata rilevata una riduzione significativa, rispetto al CTR, della vitalità cellulare in maniera tempo dipendente (Fig 19).

In particolare è stata osservata una riduzione della vitalità cellulare del  $33\% \pm 6$  dopo 24 ore ( $p < 0.01$ ) e del  $44\% \pm 5$  dopo 72 ore ( $p < 0.01$ ) di trattamento con DOX rispetto al CTR. Inoltre è stata osservata una riduzione di vitalità cellulare in seguito a trattamento con CIS rispetto al controllo:  $26\% \pm 4$  dopo 24 ore ( $p < 0.01$ ) e  $32\% \pm 5$  dopo 72 ore ( $p < 0.01$ ).



**Fig 19.** Valutazione dell'effetto di DOX e CIS sulla vitalità cellulare mediante saggio SRB, dopo 24 e 72 ore di trattamento. I dati sono rappresentati come trattamento/controllo %. Ogni colonna rappresenta la media ( $\pm$  SD) di cinque esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs CTR.

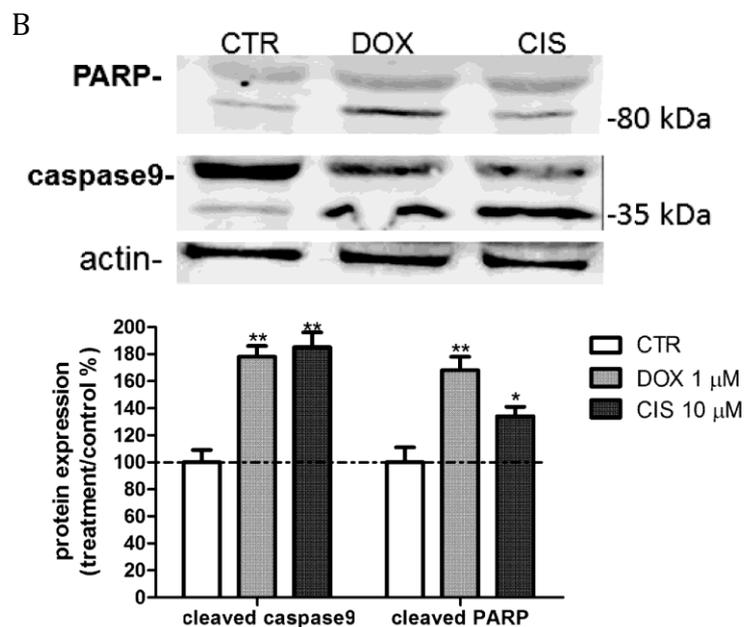
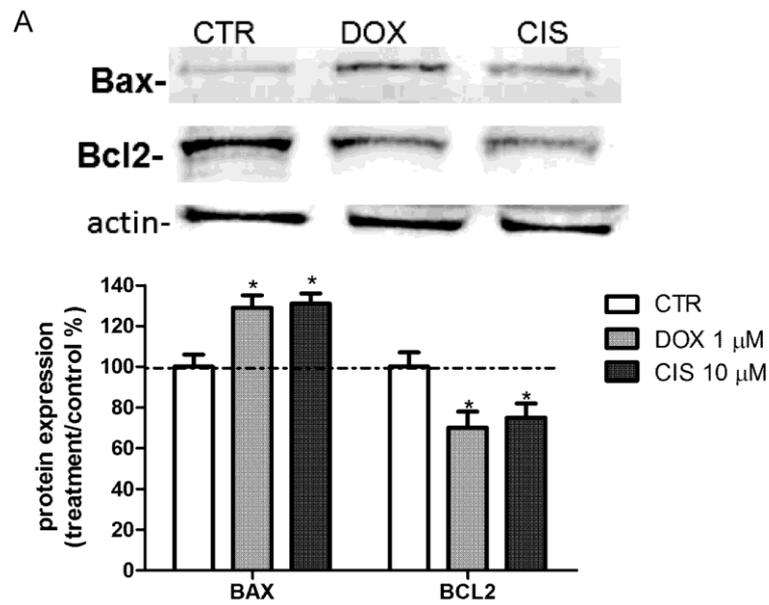
#### 4.2.3.3. Western Blot

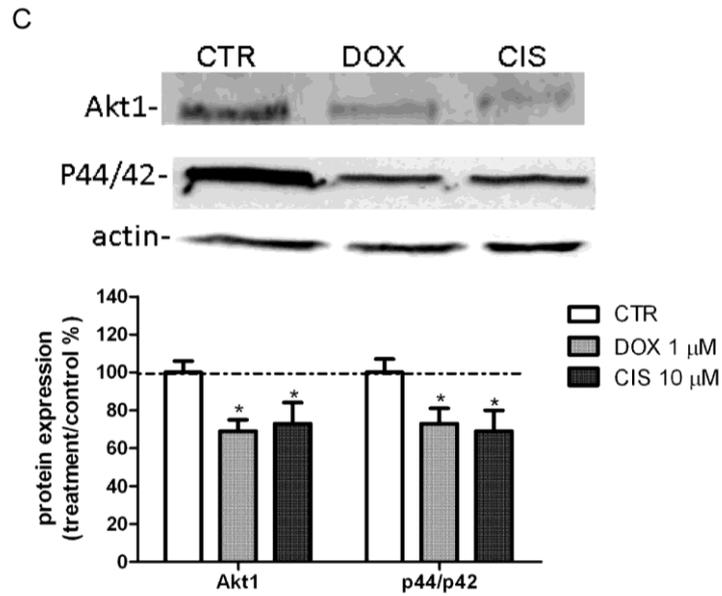
Mediante Western blot, dopo 24 ore di trattamento chemioterapico, è stata valutata l'attivazione dei processi apoptotici (Bax/Bcl2, PARP1, caspasi-9) e l'inibizione dei processi di proliferazione e differenziamento (Akt1 e MAPK/ERK1/2) come possibili meccanismi d'azione di tali farmaci.

I risultati ottenuti hanno mostrato un aumento significativo dell'espressione di Bax (DOX  $+34\% \pm 6$  e CIS  $+37\% \pm 8$ ,  $p < 0.05$ ) e una riduzione significativa di Bcl-2 (DOX  $-35\% \pm 5$  e CIS  $-32\% \pm 7$ ,  $p < 0.05$ ) in seguito a trattamento con DOX 1 µM o con CIS 10 µM (Fig 20A), indicando la capacità di questi chemioterapici di indurre morte cellulare mediante apoptosi nelle cellule stromali ovariche.

Sia il trattamento con DOX che con CIS hanno determinato il clivaggio della forma di 47 kDa del proenzima caspasi 9 nella sua forma attivata da 35 kDa (DOX +82%  $\pm$  8 e CIS +88%  $\pm$  10,  $p < 0.01$ ) e di PARP-1, tipicamente presente in una banda da 89 kDa (DOX +68%  $\pm$  9,  $p < 0.01$ ; CIS +37%  $\pm$  7;  $p < 0.05$ ) (Fig 20B).

Infine è stato valutato l'effetto di DOX e CIS sull'espressione di Akt1, coinvolto nella regolazione dell'apoptosi, e di Akt regolato da MAPK, coinvolti nella proliferazione e differenziamento cellulare. DOX e CIS hanno determinato una riduzione significativa dell'espressione di Akt1 (DOX -37%  $\pm$  5 e CIS -28%  $\pm$  4,  $p < 0.05$ ) (Fig 20C). Inoltre entrambi i farmaci hanno comportato una riduzione significativa dell'espressione di p44/42-MAPK/ERK1/2 (DOX -32%  $\pm$  5 e CIS -34%  $\pm$  5,  $p < 0.05$ ) (Fig 20C).



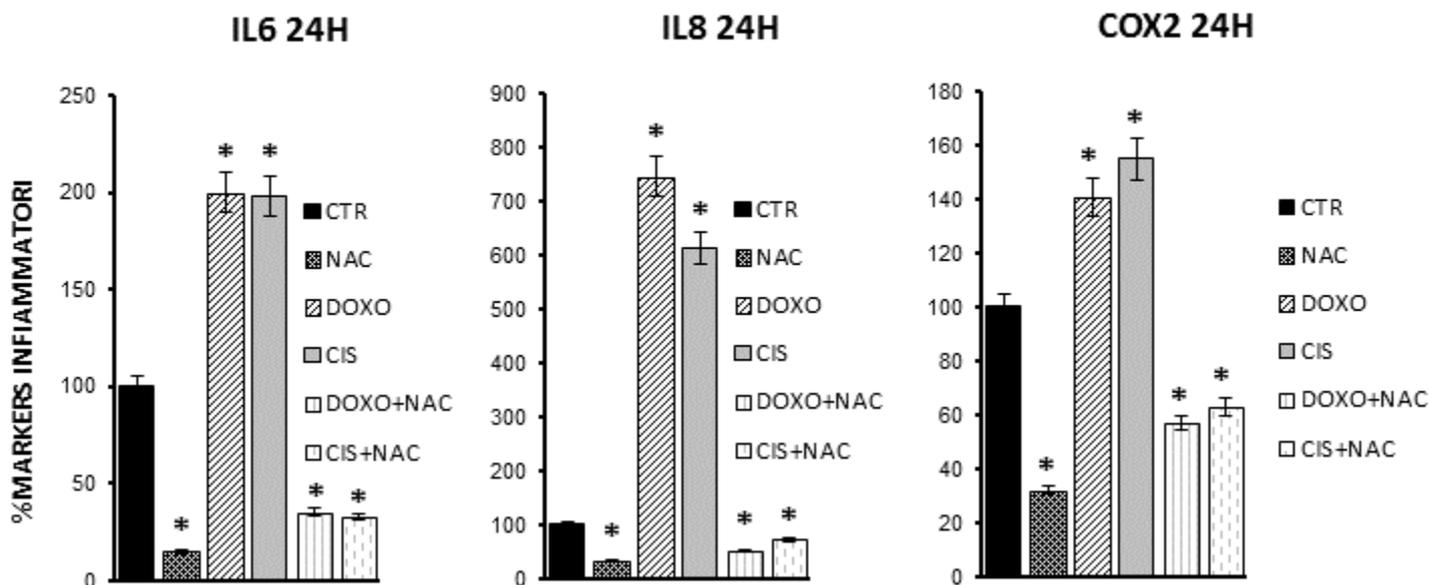


**Fig 20.** Effetto apoptotico di DOX e CIS su cellule stromali ovariche: valutazione dell'espressione di Bax e Bcl-2(A), caspasi9 (B), PARP(B), Akt1 (C) e p44/p42 (C). I dati sono riportati come rapporto, in percentuale, tra trattamento/controllo. Ogni colonna rappresenta la media ( $\pm$  SD) di cinque esperimenti indipendenti.

\*  $p < 0.05$  vs CTR; ANOVA  $n = 5$

#### 4.2.4 Effetto della NAC sui danni indotti da DOX e CIS sulle cellule in coltura

La Real-Time-PCR, effettuata per misurare i livelli di espressione di alcuni markers di infiammazione, ha confermato un'azione protettiva della NAC nei confronti dei danni indotti dal trattamento con i farmaci chemioterapici (Fig 21). Le cellule stromali trattate con DOX e CIS per 24 ore hanno mostrato elevati livelli dei markers infiammatori IL6, IL8 e COX2 (IL6 aumento del 100% e del 98% rispetto al controllo,  $P < 0,05$ ; IL8 aumento del 646% e del 512% rispetto al controllo,  $P < 0,05$ ; COX2 aumento del 41% e del 55% rispetto al controllo,  $P < 0,05$ ). Tali livelli si sono ridotti drasticamente in seguito a trattamento con DOX+NAC e CIS+NAC per 24 ore (IL6 riduzione del 65% e del 55% rispetto al controllo,  $P < 0,05$ ; IL8 riduzione del 86% e del 72% rispetto al controllo,  $P < 0,05$ ; COX2 riduzione del 43% e del 37% rispetto al controllo,  $P < 0,05$ ).



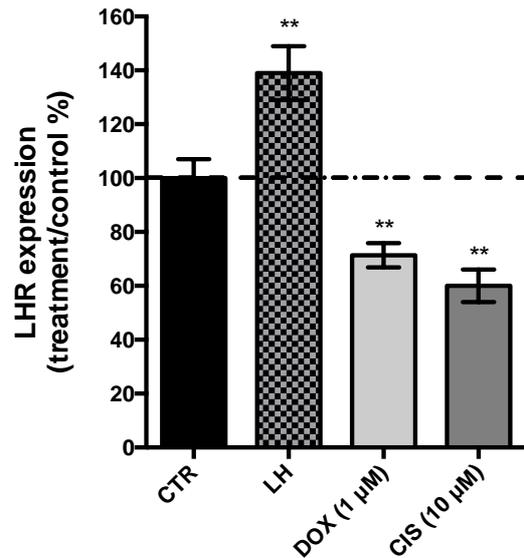
**Fig 21.** Valutazione dell'effetto di NAC, DOX, CIS, DOXO+NAC e CIS+ NAC sui livelli di markers infiammatori IL6, IL8 e COX2 dopo 24 ore di trattamento. I dati sono rappresentati come %. Ogni colonna rappresenta la media ( $\pm$  SD) di cinque esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \*  $p < 0.05$ , ANOVA  $n = 5$

#### 4.2.5. Effetto dell'LH sui danni indotti da DOX e CIS sulle cellule in coltura

Dopo aver dimostrato la presenza del recettore per LH (LHR) sulle cellule stromali in coltura, è stato valutato l'effetto dell'LH 200 mIU/mL sulle cellule stromali ovariche in coltura, da solo e in combinazione con DOX o CIS.

L'espressione del recettore è stata analizzata in cellule non trattate (CTR) e in cellule trattate, per 24 ore, con LH, DOX o CIS. I dati ottenuti, hanno mostrato un aumento del 39% ( $p = 0.0038$ ), rispetto al controllo, dell'espressione del recettore in seguito a somministrazione di LH (Fig 22). Di contro, il trattamento con i chemioterapici ha determinato una riduzione che, seppur significativa (29% nel caso di DOX,  $p = 0.0049$ ; 45% nel caso di CIS,  $p = 0.0032$ ), non risultava tale da depauperare il pool recettoriale.

L'LH può, quindi, agire sulle cellule stromali ovariche anche se trattate con chemioterapici.



**Fig 22.** Valutazione dell'espressione del recettore per LH su cellule stromali ovariche. I dati sono riportati come rapporto, in percentuale, tra trattamento/controllo. Ogni colonna rappresenta la media ( $\pm$  SD) di cinque esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0.01$  vs CTR; ANOVA  $n = 5$

Al fine di valutare l'effetto protettivo dell'LH nei confronti dei chemioterapici, le cellule sono state trattate con LH, DOX, CIS e cosomministrazione di LH e chemioterapico (DOX o CIS). Alcune cellule non sono state trattate in maniera tale da fungere da controllo.

La valutazione è stata effettuata a 24 e 72 ore dal trattamento mediante saggio della sulforodamina B.

Tale analisi hanno permesso di osservare che il trattamento con il solo LH ha determinato una vitalità cellulare dell'84% dopo 24 ore (CTR vs LH: non significativo,  $p = 0.0554$ ) e del 68% dopo 72 ore (CTR vs LH:  $p = 0.0211$ ) rispetto al controllo (Fig 23A-B).

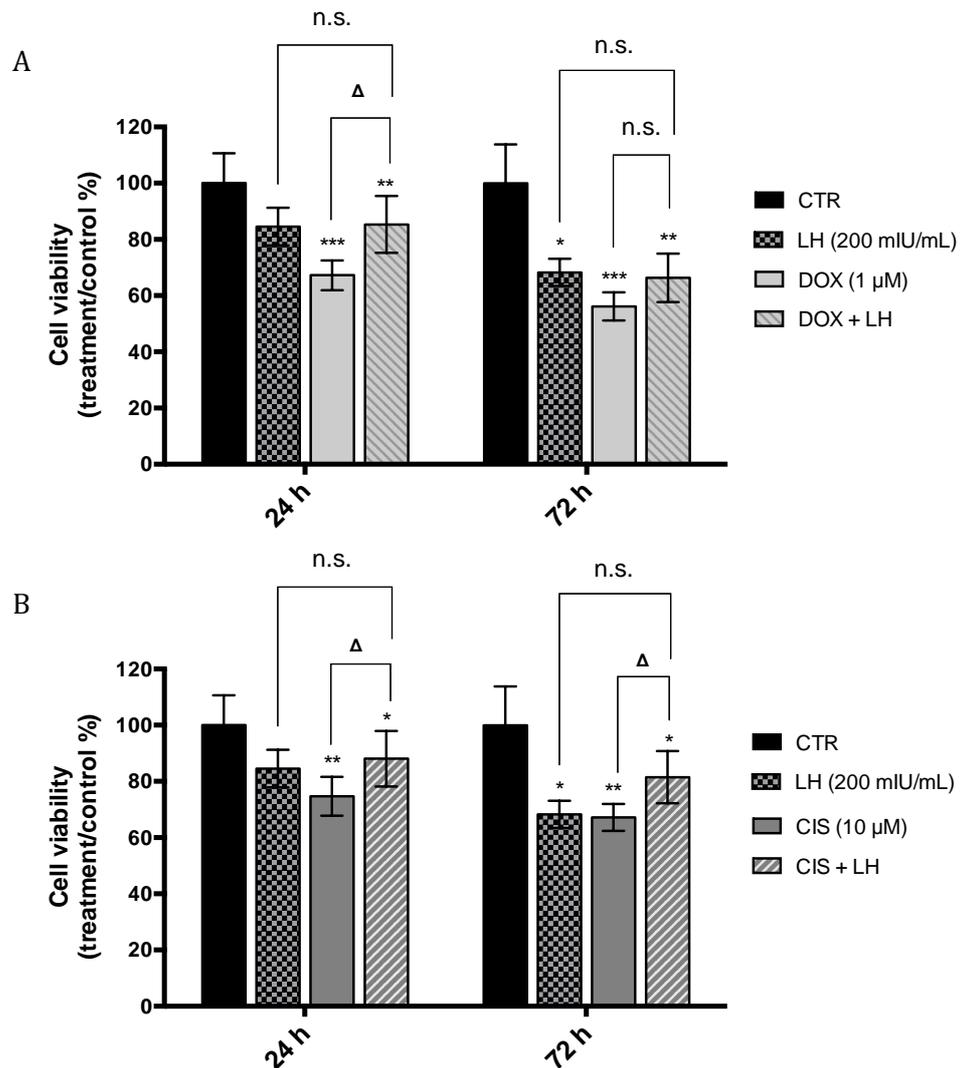
Il cotrattamento con LH e DOX per 24 ore ha determinato una sopravvivenza cellulare dell'85% contro il 67% osservato in seguito a somministrazione di sola DOX (DOX vs DOX+LH:  $p = 0.0147$ ) (Fig 23A); a 72 ore di cotrattamento con DOX e LH è stata osservata una sopravvivenza del 67% contro il 56% osservato con la somministrazione di sola DOX (DOX vs DOX+LH: non significativo,  $p=0.1815$ ) (Fig 23A).

Il cotrattamento con LH e CIS per 24 ore ha determinato una vitalità cellulare dell'88% contro il 74% osservato in seguito a somministrazione di solo CIS (CIS vs CIS+LH:  $p = 0.0221$ ) (Fig 23B); dopo 72 ore di

cotrattamento con CIS e LH è stata osservata una vitalità dell'81,5% contro il 67% del trattamento isolato (CIS vs CIS+LH:  $p=0.0290$ ) (Fig 23B).

Il trattamento con LH in associazione sia con DOX che con CIS ha comportato un miglioramento della vitalità cellulare. Tale vitalità è, inoltre, paragonabile a quella osservata in seguito a trattamento con il solo LH:

- LH vs DOX+LH non significativo sia dopo 24 ore ( $p=0.9998$ ) che dopo 72 ore ( $p=0.9914$ ) (Fig 23A);
- LH vs CIS+LH non significativo sia dopo 24 ore ( $p=0.9150$ ) che dopo 72 ore ( $p=0.0822$ ) (Fig 23B).



**Fig 23.** Valutazione dell'effetto di LH, DOX e DOX+LH (A) e di LH, CIS e CIS+LH (B) sulla vitalità cellulare, mediante saggio SRB, dopo 24 e 72 ore di trattamento. I dati sono rappresentati come trattamento/controllo %. Ogni colonna rappresenta la media ( $\pm$  SD) di cinque esperimenti indipendenti condotti in triplicato. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.00$ ,  $\Delta$   $p < 0.05$ . ANOVA  $n = 5$

## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nell'ultimo decennio il tasso di sopravvivenza delle pazienti oncologiche è aumentato grazie alla diagnosi precoce ed ai progressi terapeutici (Blumenfeld 2012). I trattamenti antitumorali sono gonadotossici e possono danneggiare le ovaie inducendo una deplezione irreversibile del patrimonio follicolare che si traduce in una riduzione parziale/totale della funzionalità steroidogenica e del potenziale riproduttivo delle ovaie (Meirow et al. 2001). Ciò comporta assenza del menarca nelle bambine prepuberi e fallimento ovarico precoce ed infertilità nelle giovani donne.

La crioconservazione di tessuto ovarico, prima dell'inizio dei trattamenti antitumorali, rappresenta una valida strategia per preservare la funzione steroidogenica e gametogenica delle giovani pazienti oncologiche.

Alla remissione della malattia, il tessuto ovarico scongelato può essere reimpiantato ortotopicamente nel sito di origine, permettendo il ripristino della funzione endocrina e riproduttiva della paziente, la ripresa del ciclo mestruale e il concepimento naturale; oppure può essere reimpiantato eterotopicamente in siti molto vascolarizzati, permettendo il ripristino della funzione endocrina e il recupero di ovociti maturi da utilizzare in un programma di fecondazione in vitro. Ad oggi, i risultati ottenuti in seguito a reimpianto di tessuto ovarico crioconservato sono molto incoraggianti: la ripresa della funzione endocrina è stata riportata nell'80-90% dei casi di reimpianto ortotopico e sono nati circa 80 bambini sani (la percentuale di nascite/reimpianto è del 37%). In seguito a reimpianto eterotopico la ripresa della funzione endocrina è stata osservata ugualmente nell'80-90% dei casi ed è stata ottenuta una gravidanza gemellare. Entrambe le modalità di reimpianto hanno inoltre permesso l'induzione della pubertà in 2 bambine (Congresso SIGO 2016).

Questa procedura comporta tuttavia una riduzione del 30% del pool follicolare e una sub-ottimale preservazione stromale. Dal momento dell'espanto al reimpianto, il tessuto ovarico è sottoposto a ischemia, ipossia, tossicità dei crioprotettori, basse temperature che determinano una eccessiva produzione di specie radicaliche reattive (SRR). Tale eccesso può causare: a) frammentazione del DNA, con conseguente apoptosi; b) perossidazione lipidica, con conseguente danno delle membrane cellulari; c) alterazioni delle proteine strutturali, con danni funzionali della cellula. E' ragionevole ipotizzare che l'impiego di agenti antiossidanti nelle soluzioni

di crioconservazione costituisca una strategia utile per preservare la funzionalità dei sistemi endogeni cellulari.

A tale scopo, il primo obiettivo del presente progetto è stato studiare l'effetto dell'antiossidante N-acetilcisteina (NAC) sulle caratteristiche morfo-funzionali del tessuto ovarico sottoposto a crioconservazione. È stata scelta la NAC in quanto ampiamente utilizzata in campo umano per prevenire/ridurre i danni indotti dallo stress ossidativo in numerose patologie quali cancro, malattie cardiovascolari, HIV, disordini neurologici e patologie del fegato.

Studi della letteratura, in modelli animali e umani, riportano gli effetti positivi dell'aggiunta di agenti antiossidanti nelle soluzioni di crioconservazione sulla preservazione morfologica e sulla vitalità del tessuto ovarico crioconservato. La L-Glutammina e la Taurina determinano una buona preservazione morfologica e funzionale del tessuto ovarico umano sottoposto a congelamento lento (Sanfilippo et al., 2013). La vitamina E previene lo stress a livello del reticolo endoplasmatico nel tessuto ovarico crioconservato di scimmie (Brito et al., 2014). L'acido ascorbico aumenta la percentuale di follicoli primordiali con morfologia e vitalità normale dopo vitrificazione e coltura del tessuto ovarico di pecora (Melo et al., 2011).

Tuttavia la letteratura attuale è priva di studi che quantificano i livelli di SRR nel tessuto ovarico durante tutte le fasi della crioconservazione. A causa dell'alta reattività, dell'instabilità e della breve emivita delle SRR, la determinazione dei livelli di queste specie in vivo è ancora difficile da eseguire e poco praticata. Paolini et al. hanno sviluppato un metodo per misurare i livelli di SRR nei tessuti umani. Questo metodo sfrutta un approccio basato sulla determinazione dei radicali intracellulari dell'azoto sfruttando la tecnica EPR (Paolini et al., 1996). Le reazioni avvengono in presenza di una particolare idrossilammina, che ha la corretta lipofilicità per attraversare le membrane cellulari e distribuirsi nei compartimenti intra- ed extracellulari, andando ad interagire con le SRR. Fino ad ora questa tecnica è stata applicata con successo nei microsomi, nelle colture cellulari e in tessuti di origine animale e umana (Canistro et al., 2010; Mancarella et al., 2008).

Nel presente studio la tecnica EPR è stata utilizzata per la prima volta per monitorare e quantificare i livelli di SRR durante tutto il processo di crioconservazione del tessuto ovarico umano. Utilizzando la tecnica standard di crioconservazione i livelli di SRR nel tessuto ovarico erano

significativamente più elevati di quelli presenti nel tessuto fresco, associati ad estesi danni morfologici ed ultrastrutturali a carico di follicoli e stroma. Il mantenimento del tessuto scongelato a 4°C per 2 ore determinava solo una leggera riduzione dei livelli di SRR, mentre le caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali del tessuto ovarico erano paragonabili a quelle osservate nel tessuto subito dopo scongelamento.

La supplementazione di NAC determinava a livello ovocitario preservazione dell'integrità del DNA, dell'architettura del citoplasma e della distribuzione degli organelli; a livello stromale determinava riduzione della formazione dell'edema interstiziale. Inoltre in presenza di NAC l'apoptosi osservata nelle cellule della granulosa e nelle cellule stromali era comparabile a quella osservata nei campioni freschi. L'indagine immunohistochimica dell'indice proliferativo mostrava positività negli ovociti in tutte le condizioni sperimentali, indicando che il nucleo non subisce danni durante le procedure di congelamento ed è in grado di riprendere il ciclo mitotico.

Questi risultati indicano che la NAC ha avuto un ruolo importante nel proteggere il tessuto ovarico durante il processo di crioconservazione. L'azione protettiva della NAC è legata alle sue proprietà nucleofile ed antiossidanti. La NAC infatti è in grado di attraversare facilmente la membrana sarcolemmatica, dove viene utilizzata come analogo della cisteina e come precursore del glutathione ridotto (GSH), così da aumentare l'attività della glutathione-S-transferasi, della GSH-perossidasi, della GSH-reduttasi, della NADH- e NAD(P)H-chinone reduttasi. Inoltre la NAC è anche in grado di promuovere la riparazione del DNA proteggendo l'attività della ADPribosiltransferasi (Mura et al., 2003).

Sulla base dei risultati ottenuti, il secondo obiettivo del presente progetto è stato quello di valutare l'effetto protettivo della NAC sulla preservazione delle caratteristiche morfo-funzionali del tessuto ovarico crioconservato sottoposto a trattamento con chemioterapici. La ricerca nel campo della preservazione della fertilità si sta infatti incentrando sull'individuazione di nuove strategie atte a ridurre gli effetti gonadotossici dei trattamenti antitumorali.

Nel presente studio è stato valutato l'effetto della NAC e dell'ormone luteinizzante (LH) sul tessuto ovarico trattato in vitro con doxorubicina 1  $\mu$ M (DOX) e cisplatino 10  $\mu$ M (CIS), chemioterapici comunemente utilizzati nei regimi terapeutici dei linfomi, carcinomi mammari e sarcomi. Le concentrazioni utilizzate nello studio sono state scelte poiché

paragonabili ai picchi di concentrazione plasmatica dei farmaci osservati nelle pazienti dopo una singola infusione a scopo terapeutico (Minotti et al. 2004; Tropitzsch et al. 2014).

Il primo step è stato quello di ottenere una coltura pura di cellule stromali. Le problematiche principali erano legate a due aspetti fondamentali: primo la difficoltà di recuperare un alto numero di cellule vitali da tessuto ovarico sottoposto a crioconservazione e successivo isolamento meccanico ed enzimatico; secondo l'eterogeneità di tipi cellulari che costituiscono il tessuto ovarico (ovociti, cellule della granulosa, cellule stromali e cellule epiteliali).

L'analisi ultrastrutturale delle cellule isolate da tessuto ovarico ha mostrato una buona preservazione, supportando la validità del protocollo di crioconservazione e d'isolamento delle cellule stromali, e la mesenchimalità delle cellule in coltura. La purezza delle cellule stromali coltivate è stata dimostrata dalla positività per l'espressione della vimentina (marcatore specifico delle cellule mesenchimali) e dalla negatività per l'espressione della citocheratina. È plausibile ipotizzare che in presenza di cellule vimentina-positive, caratterizzate da un'intensa attività proliferativa, le poche cellule citocheratina-positive abbiano perso in coltura la loro capacità replicativa e siano andate incontro a degenerazione (Auersperg et al., 2001, Bukovsky et al., 2004).

I saggi di vitalità/citotossicità delle cellule stromali in coltura hanno permesso di evidenziare l'effetto tossico della DOX e del CIS sulle cellule stromali, mostrando cellule con un aspetto morfologico alterato (cellule tondeggianti), con ridotta vitalità cellulare e inibizione della crescita cellulare. Al contrario le cellule non trattate (controllo) presentavano aspetto fibroblastico e positività citoplasmatica per la calceina (indice di vitalità). Questi effetti tossici sulle cellule stromali sembrano essere dovuti all'attivazione di processi apoptotici in modo tempo dipendente. Il pathway apoptotico attivato nelle cellule stromali ovariche in coltura coinvolge le proteine Bcl2-Bax, il rilascio di citocromo C dai mitocondri, l'attivazione della caspasi9 e di PARP1. La DOX e il CIS, inoltre, causano danno al DNA attraverso l'inibizione di Akt ed ERK (Dasari and Tchounwou 2014, Hayakawa et al., 2004, Brazil et al., 2011). Queste molecole, in condizioni fisiologiche, hanno un ruolo nella regolazione della crescita cellulare, sviluppo, differenziamento ed apoptosi (Murphy et al., 2006). In seguito al trattamento con i chemioterapici l'espressione di Akt1 e di ERK nelle

cellule ovariche normali è ridotta, aumentando il segnale di morte cellulare (Dasari and Tchounwou 2014, Small et al., 2003).

I nostri dati sono in accordo con studi pubblicati precedentemente in campo animale. L'esposizione alla DOX di ovociti di topo, ovulati (Perez et al. 1997) o allo stadio di vescicola germinale (Bar-Joseph et al. 2010), determina frammentazione dei cromosomi, attivazione delle caspasi mitocondriali e presenza di corpi apoptotici nel citoplasma. Uno studio condotto da Morgan et al. ha evidenziato un effetto dannoso della DOX a livello delle cellule della granulosa dei follicoli in stadi maturativi avanzati e un effetto tossico del CIS sugli ovociti dei follicoli primari (Morgan et al. 2013). Li et al. hanno dimostrato che la gonadotossicità del trattamento con il CIS è, invece, legata alla capacità del farmaco di indurre stress ossidativo nelle cellule della granulosa, con conseguente apoptosi di quest'ultime e degenerazione follicolare (Li et al. 2013). Roti et al. hanno osservato che l'accumulo della DOX a livello delle ovaie di topo avviene prima nelle cellule stromali (2 ore dopo l'iniezione) e solo successivamente nelle cellule della granulosa (4 ore dopo l'iniezione) con conseguente apoptosi follicolare (8 ore dopo l'iniezione). È possibile ipotizzare che le cellule stromali proteggano i follicoli dall'insulto tossico sequestrando al proprio interno il farmaco (Roti et al. 2012). Tale effetto della DOX sulle componenti ovariche, germinali e non, è stato osservato anche da Soleimani et al. in uno studio condotto su tessuto ovarico umano crioconservato (Soleimani et al 2011).

Una volta individuati i pathway con cui DOX e CIS causano danni cellulari in coltura, è stato valutato l'effetto protettivo della NAC e dell'LH in coltura.

Le cellule stromali trattate con DOX e CIS per 24 ore mostravano elevati livelli di markers infiammatori, che tendevano a ridursi drasticamente quando le cellule stromali erano trattate con i chemioterapici in combinazione con NAC per 24 ore. Anche in questo caso l'effetto protettivo della NAC va ricondotto alle sue proprietà nucleofile ed antiossidanti.

L'LH induceva da un lato una lieve riduzione della vitalità cellulare, dall'altro resistenza alla citotossicità indotta da DOX e CIS, sebbene i meccanismi d'azione con cui esplica tale effetto non siano ancora stati indagati.

Un lieve effetto apoptotico dell'LH in coltura è stato riportato anche da altri autori. Duleba et al. hanno mostrato una riduzione del 13-25% della sintesi di DNA in cellule stromali ovariche di topo trattate con LH per 24 ore, che

diventa significativamente maggiore dopo 48 e 72 ore ed una diminuzione non significativa del numero di cellule presenti in coltura dopo 72 ore dal trattamento. L'LH, quindi, agirebbe sullo stroma corticale ovarico come regolatore dell'omeostasi tissutale: l'ormone andrebbe ad indurre apoptosi cellulare al fine di proteggere l'ovaio dall'iperplasia, mantenendo, in tal modo, l'integrità strutturale fondamentale per il corretto funzionamento dell'organo. Il meccanismo sembra essere dovuto all'accumulo intracellulare di cAMP con conseguente alterazione della sintesi del DNA e riduzione del numero di cellule mediante apoptosi (Duleba et al. 1999; Spaczynski et al. 2005; Bley et al. 1992; Zwain and Amato 2001).

In letteratura, studi condotti su cellule leucemiche pre-B umane mostrano un miglioramento della sopravvivenza cellulare in seguito a trattamento contemporaneo con DOX e sostanze che inducono un incremento del livello di cAMP intracellulare. Secondo gli autori, in seguito a trattamento con DOX, alti livelli di cAMP determinerebbero un'alterazione dell'equilibrio tra fattori pro-apoptotici e fattori anti-apoptotici indotti dal danno al DNA, in modo tale da inibire l'attivazione del processo di morte cellulare (Safa et al. 2010A; Safa et al. 2010B; Fatemi et al. 2015). Mishima et al. hanno analizzato cellule epiteliali renali di maiale trattate solo con CIS oppure con CIS ed agenti stimolanti la produzione di cAMP intracellulare: nel secondo caso si osserva un significativo aumento dell'attività della SOD e riduzione della perossidazione lipidica (Mishima et al. 2005). Anche lo studio di Qin e collaboratori, condotto in cellule epiteliali renali di topo trattate con CIS e analoghi del cAMP o agenti stimolanti la sua produzione, ha rilevato una riduzione dell'attività della caspasi 3 (ruolo pro-apoptotico) e attivazione di Epac (effetto anti-apoptotico) in seguito al trattamento combinato (Qin et al. 2011).

In conclusione, il presente studio ha dimostrato gli effetti protettivi della NAC sul tessuto ovarico sottoposto a crioconservazione; tuttavia il non raggiungimento dei livelli di SRR osservati nei campioni di controllo suggerisce che probabilmente la concentrazione di NAC utilizzata non sia stata sufficiente ad eliminare i radicali liberi prodotti durante il processo di crioconservazione. Ulteriori studi sono necessari per testare concentrazioni di NAC più efficaci oppure per individuare altre sostanze antiossidanti applicabili in campo umano che siano in grado di ridurre al minimo i livelli di SRR.

Inoltre lo studio ha dimostrato che DOX e CIS alle dosi terapeutiche inducono in vitro morte delle cellule dello stroma ovarico mediante l'attivazione di meccanismi apoptotici, confermando le capacità di tali chemioterapici di compromettere la fertilità di donne sottoposte a terapia antitumorale. Occorre tener conto, tuttavia, che una paziente solitamente è sottoposta a più cicli di chemioterapia. Inoltre, l'estensione del danno citotossico, è dipendente anche dagli schemi di chemioterapia adottati, che spesso prevedono l'associazione di DOX e CIS con ulteriori farmaci antitumorali. Pertanto, il danno ovarico in vivo potrebbe essere molto più esteso rispetto a quello osservato in vitro in questo studio.

Ulteriori studi sono necessari al fine di investigare eventuali altri meccanismi mediante cui DOX e CIS inducono morte cellulare nelle cellule stromali e nelle altre componenti del tessuto ovarico umano, quali cellule della granulosa, ovociti e vasi sanguigni. Ciò è estremamente importante al fine di comprendere meglio il rischio di fallimento ovarico ad essi associato e poter fornire un counseling completo alle giovani pazienti oncologiche sul rischio di danno ovarico indotto dalla chemioterapia e sulle possibilità di preservare la funzionalità ovarica.

Infine lo studio ha dimostrato la capacità di NAC ed LH di contrastare gli effetti citotossici di DOX e CIS. Ulteriori studi sono necessari per poter collocare queste sostanze nella categoria di "ferti-save agents" e quindi poterle prescrivere alle pazienti in concomitanza con il trattamento chemioterapico. La ricerca in questo campo dovrebbe continuare al fine di individuare altre sostanze efficaci nel proteggere le ovaie.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. *The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective*. Endocr Rev (2002); 23(2):141-174
- Ashkenazi H, Cao X, Motola S et al. *Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response*. Endocrinology (2005); 146:77-84
- Ashwood-Smith MJ, Morris GW, Fowler R, et al. *Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures*. Human Reprod (1988); 3:795-802.
- Auersperg N, Wong AS, Choi KC, et al. *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. Endocr Rev (2001); 22, 255–288
- Bar-Joseph H, Ben-Aharonb I, Rizelb S et al. *Doxorubicin-induced apoptosis in germinal vesicle (GV) oocytes*. Reproductive Toxicology (2010); 30:566–572
- Bath LE, Anderson RA, Critchley HO et al. *Hypothalamic- pituitary-ovarian dysfunction after prepubertal chemotherapy and cranial irradiation for acute leukaemia*. Hum Reprod (2001); 16:1838-1844
- Bellon SF, Coleman JH, Lippard SJ. *DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II)*. Biochemistry (1991); 30(32):8026-8035.
- Berlin V, Haseltine WA. *Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen*. J Biol Chem (1981); 256:4747-4756
- Bley MA, Simón JC, Estevez AG et al. *Effect of follicle- stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis*. Endocrinology (1992); 131:1223-1229
- Blumenfeld Z. *Chemotherapy and fertility*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology (2012); 26:379–390
- Blumenfeld Z, Evron A. *Preserving fertility when choosing chemotherapy regimens – the role of gonadotropin-releasing hormone agonist*. Expert Opin Pharmacother (2015); 16(7):1009-1020
- Brazil DP, Hemmings BA. *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends Biochem Sci (2001); 26, 657–664
- Brito DC, Brito AB, Scalercio SR, et al. *Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey (Sapajus apella)*. Cell Tissue Res (2014); 355,471-480
- Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER et al. *Female reproductive ageing: current knowledge and future trends*. Trends Endocrinol Metab (2007); 18(2):58-65
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, et al. *ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle*. Am J Physiol Cell Physiol. (2004); Oct;287(4):C817-33. Review

- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, et al. *Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries*. *Reprod Biol Endocrinol* (2004); 2,20
- Canistro D, Affatato AA, Soleti A, et al. *The novel radical scavenger IAC is effective in preventing and protecting against post-ischemic brain damage in Mongolian gerbils*. *J Neurol Sci* (2010); 290, 90-95
- Chen W, Xu X, Wang L et al. *Low Expression of Mfn2 Is Associated with Mitochondrial Damage and Apoptosis of Ovarian Tissues in the Premature Ovarian Failure Model*. *PLoS One*(2015); 10(9):e0136421
- Chiarelli AM, Marrett LD, Darlington G. *Early menopause and infertility in females at ter treatment lor childhood cancer dragnosed in 1964-1988 in ontario, Canada*. *Am J Epidemiol* (1999); 150:245-254
- Constine LS, Woolf PS, Cann D et al. *Hypothalamic-pituitary dysfunction after radiation for brain tumors*. *N Engl J Med*(1993); 328:87-94
- Dasari S, Tchounwou PB. *Cisplatin in cacer therapy: molecular mechanism of action*. *Eur J Pharmacol* (2014); 740:364-378
- Demeestere I, Simon P, Dedeken L et al. *Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood*. *Human Reproduction* (2015)
- Demeestere I, Simon P, Emiliani S, et al. *Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation*. *Hum Reprod Update*. (2009);15(6):649-65. Review
- Donnez J, Dolmans MM. *Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice*. *J Assist Reprod Genet* (2015); 32(8):1167-1170
- Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A et al. *Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation*. *Fertility and Sterility* (2013); 9(6):1503-1513
- Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P et al. *Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review*. *Human Reproduction Update* (2006); 12(5):519-535
- Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL and Behrman HR. *Divergent mechanisms regulate proliferation/survival and steroidogenesis of theca-interstitial cells*. *Molecular Human Reproduction* (1999); 5(3):193-198
- Eastman A. *The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes*. *Pharmacology & Therapeutics* (1987); 34(2):155-166
- Ernst E, Kjærsgaard M, Birkebæk NH et al. *Case report: Stimulation of puberty in a girl with chemo- and radiation therapy induced ovarian failure by transplantation of a small part of her frozen/thawed ovarian tissue*. *European Journal of Cancer* (2013); 49:911-914

- Fabbri R, Pasquinelli G, Keane D et al. *Optimization of protocols for human ovarian tissue cryopreservation with sucrose, 1,2-propanediol and human serum*. *Reprod Biomed Online* (2010); 21(6):819-828
- Fabbri R, Pasquinelli G, Montanaro L, et al. *Healthy early preantral follicle can be obtained in a culture of frozen-thawed human ovarian tissue of 32 weeks*. *Ultrastruct Pathol* (2007); 31, 257-262
- Fabbri R, Pasquinelli G, Bracone G et al. *Fetal calf serum versus human serum: ultrastructural evaluation of protein support influence on human ovarian tissue cryopreservation*. *Ultrastruct Pathol* (2006); 30:1-8
- Fabbri R, Venturoli S, D'Errico A et al. *Ovarian tissue banking and fertility preservation in cancer patients: histological and immunohistochemical evaluation*. *Gynecol Oncol* (2003); 89(2):259-266
- Familiari G, Caggiati A, Nottola SA et al. *Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease*. *Human Reprod* (1993); 8(12):2080-2087
- Fatemi A, Kazemi A, Kashiri M and Safa M. *Elevation of cAMP Levels Inhibits Doxorubicin-Induced Apoptosis in Pre- B ALL NALM- 6 Cells Through Induction of BAD Phosphorylation and Inhibition of P53 Accumulation*. *IJMCM* (2015); 4(2):94-102
- Fleischer RT, Vollenhoven GJ, Weston GC. *The Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Fertility in Premenopausal Women*. *Obstet Gynecol Surv* (2011); 66(4):248-254
- Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. *Cryopreservation of embryos and ova*. *Fertil Steril* (1988); 49(5):743-763.
- Fujikawa S. *Freeze-fracture and etching studies on membrane damage on human erythrocytes caused by formation of intracellular ice*. *Cryobiology* (1980); 17:351-362
- Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Gonik B, Abu-Soud HM. *Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid*. *Free Radic Biol Med*. 2008 Apr 1;44(7):1295-304.
- Hayakawa J, Mittal S, Wang Y, et al. *Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress*. *Mol Cell* (2004);16,521–535
- Jamieson ER and Lippard SJ. *Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts*. *Chem Rev* (1999); 99:2467–2498
- Kim SS, Battaglia DE, Soules MR. *The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: fertility and beyond*. *Fertil Steril* (2001);75(6):1049-1055.
- Kim SS. *Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study*. *J Assist Reprod Genet* (2012) ; 29:489-493

- Lee SJ, Schover LR, Partridge AH et al. *American Society of Clinical Oncology Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients*. J Clin Oncol (2006); 24(18):2917-2931
- Li X, S, Xiangyang Lv X et al. *The mechanism of mesna in protection from cisplatin- induced ovarian damage in female rats*. J Gynecol Oncol (2013); 24(2):177-185
- Lieberthal W, Triaca V, Levine, J. *Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis*. Am J Physiol (1996); 270:700–708
- Littley MD, Shalet SM, Bearwell CG et al. *Radiation-induced hypopituitarism is dose-dependent*. Clin Endocrinol (1989); 31:363–373
- Mancarella R, Del Guerra S, Masini M, et al. *Beneficial effect of the nonpeptidyl low molecular weight radical scavenger IAC on cultured human islet function*. Cell Transplant (2008); 17, 1271-1276
- Marcello MF, Nuciforo G, Romeo R et al. *Structural and ultrastructural study of the ovary in childhood leukemia after successful treatment*. Cancer (1990); 66,2099-2104
- Mathews et al. Biochimica, terza edizione, 2004
- Mazur P. *Physical and chemical basis of injury of single-celled micro-organism subjected to freezing and thawing*. In: Meryman HT, ed. Cryobiology. New York: Academic Press. (1966);214-315.
- Meirow D. *Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients*. Mol Cell Endocr (2000); 169:123-131
- 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); 22:1626-163
- Meirow D and Nugent D. *The effect of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction*. Human reproduction Update (2001); 7(6):535-543
- Meirow D, Philosof-Kalich L, Carmely A, et al. *Follicle “burn out”. : a novel mechanism of chemotherapy induced ovarian damage*. Fertility and Sterility (2010); 94:S10-S10
- Melo MA, Oskam IC, Celestino JJ, et al. *Adding ascorbic acid to vitrification and IVC medium influences preantral follicle morphology, but not viability*. Reprod Domest Anim (2011); 46, 742-745
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E et al. *Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. Pharmacol Rev. (2004); 56(2):185-229
- Mishima K, Baba A, Matsuo M et al. *Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity*. Free Radical Biology & Medicine(2006); 40:1564-1577
- Morgan S, Lopes F, Gourley C et al. *Cisplatin and Doxorubicin Induce Distinct Mechanisms of Ovarian Follicle Loss; Imatinib Provides Selective Protection Only against Cisplatin*. PLoS ONE (2013); 8(7):e70117

- Morris GJ, McGrath JJ. *Intracellular ice nucleation and gas bubble formation in spirogyra*. *Cryo Lett* (1981); 2:341-352
- Myers C. *The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy*. *Semin Oncol* (1998); 25:10-14
- Mura M, Vagà V, Fabbri M. *Strategies of oncoprevention with antioxidants towards reactive oxygen species in tobacco smoke*. *Tabaccologia* (2003); 3: 23-28
- Murphy LO, Blenis J. *MAPK signal specificity: the right place at the right time*. *Trends Biochem Sci* (2006); 31, 268–275
- Nitiss JL. *Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy*. *Nat Rev Cancer* (2009); 9:338-350
- Oktay K. *Evidence for limiting ovaria tissue harvesting for the purpose of transplantation to women younger than 40 years of age*. *J Clin Endocrinol Metab* (2002); 87:1907-1908
- Oktem O, Oktay K. *A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve*. *Cancer Res* (2007); 67:10159-10162
- Paolini M, Pozzetti L, Pedulli GF, et al. *Paramagnetic resonance in detecting carcinogenic risk from cytochrome P450 overexpression*. *J Investi Med* (1996); 44, 470-473.
- Paolini M, Valgimigli L, Marchesi E, et al. *Taking EPR "snapshots" of the oxidative stress status in human blood*. *Free Radic Res* (2003); 37, 503-508.
- Pang B, Qiao X, Janssen L et al. *Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin*. *Nat Commun* (2013); 4:1908
- Pegg DE. *The History and Principles of Cryopreservation*. *Seminars in Reproductive Medicine* (2002); 20(1):5-13.
- Perez GI, Knudson CM, Leykin L et al. *Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction*. *Nat Med* (1997); 3:1228-1232
- Philosof-Kalich L, Carmely A, Fishel M et al. *The protective effects of AS101 against cyclophosphamide induced ovarian damage in mice. A potentially new approach for fertility preservation*. Abstracts of the 25th Annual Meeting of ESHRE, Amsterdam, The Netherlands, 28 June to 1 July, 2009.
- Poirot C, Abirached F, Prades M et al. *Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue*. *Lancet* (2012); 379(9815):588.
- Qin Y, Stokman G, Yan K et al. *cAMP signalling protects proximal tubular epithelial cells from cisplatin-induced apoptosis via activation of Epac*. *British Journal of Pharmacology*(2011); 165(4b):1137-1150
- Rahimi G, Isachenko E, Sauer H, Isachenko V, Wartenberg M, Hescheler J, Mallmann P, Nawroth F. *Effect of different vitrification protocols for*

- human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis*. *Reprod Fertil Dev*. 2003;15(6):343-9.
- Rosenberg B. *Fundamental studies with cisplatin*. *Cancer* (1985); 55(10):2303-2316.
- Roti EC, Leisman SK, Abbott DH, Salih SM. *Acute Doxorubicin Insult in the Mouse Ovary Is Cell- and Follicle-Type Dependent*. *PLoS ONE* (2012); 7(8):e42293
- Ruvolo G, Bosco L, Pane A et al. *Lower apoptosis rate in human cumulus cells after administration of recombinant luteinizing hormone to women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization procedures*. *Fertility and Sterility* (2007); 87(3):542-546
- Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V. *Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention*. *Hearing Research* (2007); 226:157-167
- Safa M, Kazemi A, Zand H et al. *Inhibitory role of cAMP on doxorubicin-induced apoptosis in pre-B ALL cells through dephosphorylation of p53 serine residues*. *Apoptosis* (2010); 15(2):196-203. A
- Safa M, Zand H, Mousavizadeh K et al. *Elevation of cyclic AMP causes an imbalance between NF-kappaB and p53 in NALM-6 cells treated by doxorubicin*. *FEBS Letters* (2010);584(15):3492-3498. B
- Sanfilippo S., Canis M., Romero S., Sion B., Déchelotte P., Pouly J.L., Janny L., Smitz J. and Brugnion F. (2013). *Quality and functionality of human ovarian tissue after cryopreservation using an original slow freezing procedure*. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30, 25-34.
- Schmidt KT, Larsen EC, Andersen CY, Andersen AN. *Risk of ovarian failure and fertility preserving methods in girls and adolescents with a malignant disease*. *BJOG* (2010); 117(2):163-174
- SIGO 2016. La salute al femminile tra sostenibilita' e societa' multi-etnica 16/19 Ottobre 2016. Roma
- Small GW, Somasundaram S, Moore DT, et al. *Repression of mitogen activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1 by anthracyclines contributes to their antiapoptotic activation of p44/42-MAPK*. *J Pharmacol Exp Ther* (2003); 307,861–869
- Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z and Oktay K. *Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise*. *Aging (Albany NY)*(2011); 3(8):782-793
- Spaczynski RZ, Tilly JL, Mansour A and Duleba AJ. *Insulin and insulin-like growth factors inhibit and luteinizing hormone augments ovarian theca-interstitial cell apoptosis*. *Molecular Human Reproduction* (2005); 11(5):319-324
- Stern CJ, Gook D, Hale LG et al. *First reported clinical pregnancy following heterotopic grafting of cryopreserved ovarian tissue in a*

- woman after a bilateral oophorectomy. *Hum Reprod* (2013); 28(11):2996-2999
- Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*. *J Pharm Pharmacol* (2013); 65(2):157-170
- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S et al. *Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects*. *Pharmacogenet Genomics* (2011); 21:440-446
- Tilly JL, Billig H, Kowalski K, Hsueh A. *Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism*. *Mol Endocrinol* (1992); 6(11):1942-1950
- Tropitzsch A, Arnold H, Bassiouni M et al. *Assessing cisplatin-induced ototoxicity and otoprotection in whole organ culture of the mouse inner ear in simulated microgravity*. *Toxicology Letters* (2014); 227:203-212
- Valgimigli L, Valgimigli M, Gaiani S. *Measurement of oxidative stress in human liver by EPR spin-probe technique*. *Free Radic Res* (2000); 33, 167-178
- Valgimigli L, Pedulli GF, Paolini M, et al. *Measurement of oxidative stress by EPR radical-probe technique*. *Free Radic Biol Med* (2001); 31, 708-716
- Valgimigli M, Valgimigli L, Trerè D, et al. *Oxidative stress EPR measurement in human liver by radical-probe technique. Correlation with etiology, histology and cell proliferation*. *Free Radic Res* (2002); 36, 939-948
- Wallace WH, Thomson AB, Kelsey TW. *The radiosensitivity of the human oocyte*. *Human Reproduction* (2003); 18(1):117-121
- Wallace WH, Thomas AB, Sarah F, Kelsey TW. *Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2005); 62(3):738-744
- Zwain I and Amato P. *cAMP-induced apoptosis in granulosa cells is associated with up-regulation of P53 and bax and down-regulation of clusterin*. *Endocr Res* (2001); 27:233-249