



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di Ricerca in

"Neuroscienze"

XXXI Ciclo

Coordinatore: Prof. Maurizio Tagliatela

TESI DI DOTTORATO

**"Anomalie della risposta alla stimolazione ovarica in cicli
PMA di II livello: ruolo di variabili ambientali, genetiche ed
endocrino-metaboliche"**

TUTOR

Prof. Carlo Alviggi

CANDIDATO

Dott. Pasquale De Rosa

ANNO ACCADEMICO 2017-2018

INDICE

Abstract **pag. 4**

Introduzione:

Gonadotropine e procreazione medicalmente assistita **pag. 6**

1. Ruolo delle variabili ambientali. Fertilità ed ambiente **pag. 11**

1.1. Benzene

Definizione e caratteristiche chimiche

Farmacocinetica

Origine e produzione

Sorgenti

Utilizzi

Legislazione

Meccanismi di tossicità

Effetti tossici

1.2 Benzene ed effetti riproduttivi

1.3 Benzene e fumo di sigaretta

I. Linea di Ricerca

Analisi dei livelli di benzene nelle donne sottoposte a tecniche di PMA

1. Basi di partenza scientifica

2. Obiettivo dello studio

3. Risultati II Linea di Ricerca:

“Association between intrafollicular concentration of benzene and outcome of controller ovarian stimulation in IVF/ICSI cycles: a pilot study”.

2. Ruolo delle variabili genetiche

pag. 43

2.1 gonadotropine e loro recettori

II. Linea di Ricerca

Associazione tra polimorfismi del recettore dell' FSH e risposta ovarica alle gonadotropine esogene in pazienti sottoposte a cicli di procreazione medicalmente assistita

1. Basi di partenza scientifica

2. Obiettivo dello studio

3. Risultati III Linea di Ricerca:

In estimated good prognosis patients could unexpected "Hyporesponse" to controlled ovarian stimulation be related to genetic polymorphisms of FSH receptor?

3. Ruolo delle variabili endocrino-metaboliche. Sindrome dell'Ovaio Policistico (PCOs) pag. 68

3.1 Epidemiologia, fattori di rischio, principali alterazioni endocrine

3.2 Approccio Diagnostico

3.3 Ruolo dell'ecografia

III Linea di Ricerca

Nuove strategie di inquadramento diagnostico ed approccio terapeutico in pazienti affette da Sindrome dell'ovaio Policistico

1. Basi di partenza scientifica

2. Obiettivo dello studio

3. Risultati I Linea di Ricerca:

"Ultrasound pattern in PCOS woman with hyperinsulinemia: a retrospective observational study"

Bibliografia

pag. 83

Abstract

A recent review conducted in 2014 (Direkvand-Moghadam et al), estimated that primary and secondary female infertility, affects about 15% of the world's female population.

The main cause of female infertility is the woman's age. Maximum fertility peak is reached around 25 years; a slow but constant decline of reproductive potential is observed in women aged between 30 and 35 years, then the reduction of the reproductive potential increase in the women over 35 years. Therefore, age of the woman, is the main risk factor for infertility as well as the most important prognostic factor for the ART cycles.

The outcome of the data recorded about the impact of different factors of infertility by the ART National Registry are:

- Male infertility: 29.3%;
- Female infertility: 37.1%;
- Male and female infertility: 17.6%;
- Idiopathic infertility: 15.1%;
- Genetic factor: 0.9%.

The main causes of female infertility are: uterine or cervical abnormalities, ovulation disorders, endometriosis, as well as factor tubal / peritoneal, immunological alterations and idiopathic causes.

With regards to the causes of infertility and the ART outcomes, we have evaluated three different lines of research:

1. Environmental pollution related to fertility
2. Diagnostic Approach to anovulation in patients with Polycystic ovarian syndrome
3. The role of Genetic Polymorphisms of FSH Receptor in the ART prognosis

Several lines of evidence suggest that exposure to environmental contaminants is involved in the pathobiology of adverse reproductive health effects. A lot of studies have shown that exposure to benzene is associated to menstrual disorders, miscarriages and other disorders of the reproductive system.

We performed an observational prospective pilot study to evaluate if levels of benzene in follicular fluid were correlated with response to controlled ovarian stimulation.

We divided the study population in two groups: Group A with a “low” intra-follicular benzene concentration (n=19, benzene <0.54 ng/mL) and Group B with a “high” intra-follicular benzene concentration (n=15, benzene ≥0.54 ng/mL).

The ovarian response to gonadotrophins and the outcome of IVF were analyzed in the two groups. It was found that ovarian response to endogenous and exogenous gonadotrophins appeared to be influenced by intra-follicular benzene levels.

In particular, Group B, with high” intra-follicular benzene concentration, had significantly higher basal FSH levels, lower estradiol peak concentration, and fewer oocytes retrieved and embryos transferred.

Polycystic ovary syndrome (PCOs) is an endocrine disease clinically characterized by anovulation, hyperandrogenism and oligomenorrhea. It affects from 5% to 10% of women in reproductive age. Ultrasound evaluation represents one of the major criteria in PCOs definition. Insulin resistance is found in a high percentage of PCOs although neither insulin resistance nor the metabolic syndrome are included in the diagnostic criteria of Rotterdam Consensus Workshop (ESHRE/ASRM, 2004).

Interestingly, there is evidence that the pathogenic mechanisms of insulin resistance-related PCOs differs from other mechanisms that cause hyperandrogenism-related PCOs. At present, there isn't correlation between PCOs pattern and insulin resistance.

Our study was designed to assess the impact of hyperinsulinism on ovarian ultrasonographic parameters in patients with PCOs. Our results show that the presence of hyperinsulinism in PCOS patients, diagnosed according to the Rotterdam criteria, is associated to an ultrasound pattern that differs from the PCO pattern without hyperinsulinism.

This observation, if confirmed by larger studies, supports the concept that the PCOS contains several entities that could be distinguishable by a complete metabolic evaluation and also by an accurate ultrasound definition.

It has been reported that 10% to 15% of young, normogonadotrophic women show suboptimal response to standard gonadotropin-releasing hormone—a long protocol. These patients require higher doses of exogenous follicle-stimulating hormone (FSH). This phenomenon could be associated with genetic characteristics. In our study, FSH receptor polymorphism was retrospectively evaluated in 42 normoresponder young women undergoing an in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycle; patients were stratified according to recombinant human FSH (r-hFSH) consumption. We retrospectively selected 17 normoresponder young patients undergoing a standard IVF/ICSI cycle, who required a cumulative dose of r-FSH >2500 UI (group A). A control group was selected randomly (ratio 1:2) among normoresponder young patients undergoing a standard IVF/ICSI cycle, who required a cumulative dose of r-FSH <2500 UI (group B).

Our study confirms that the FSH-R genotype may interfere with physiological responsiveness of the target organ to FSH stimulation. The presence of the FSH-R Ser680 variant seems to result in a significant decrease in ovarian response to r-hFSH during ART cycles and, therefore, in a significant increase in drug consumption. More specifically, among patients requiring a higher cumulative dose of r-hFSH (group A), the expression of Ser/Ser genotype was significantly higher compared to the subgroups carrying variants Asn/Ser and Asn/Asn of FSH-R.

INTRODUZIONE

Gonadotropine e procreazione medicalmente assistita

Un programma di procreazione medicalmente assistita (PMA) si basa su un adeguato grado di risposta ovarica alla stimolazione con gonadotropine esogene ovvero, nel caso delle tecniche di fecondazioni *in vitro*, all'induzione della crescita follicolare multipla (ICFM). Sulla base dei presupposti della sopra menzionata "teoria delle due cellule", la somministrazione contemporanea di FSH ed LH sembrava inizialmente indispensabile nei procedimenti ai fini della crescita follicolare multipla fino alle fasi pre-ovulatorie. Da sottolineare che i due ormoni, nei preparati estrattivi a base di *human menopausal gonadotropin* (hMG), erano presenti in quantità sovrapponibili, ossia con un rapporto FSH/LH di 1:1. Nel tempo si è osservato, invece, come la presenza di livelli di LH sovrafisiologici (di origine endogena e/o consequenziale alla somministrazione esogena dell'ormone) durante la fase proliferativa precoce-intermedia comportasse una serie di effetti deleteri sulla maturazione follicolare (concetto dell' LH *ceiling*), tali da riflettersi in un decremento significativo della qualità ovocitaria (Polan, 1986). Verosimilmente, il riscontro di tali dati si poneva in relazione ad alterazioni della quantità e dei rapporti esistenti tra i differenti androgeni intra-follicolari. Si tratta di un fenomeno analogo a quello che si verifica nel corso di cicli spontanei in alcune condizioni patologiche come la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS): l'aumento degli androgeni nel micro-ambiente follicolare tipici della PCOS, indotti dalle concentrazioni elevate di LH circolante, si riflette in una riduzione dell'attività dell'aromatasi, con un aumento di androgeni non più convertiti nei rispettivi ormoni femminili. Ne deriverebbe, quindi, una errata modulazione della biosintesi estrogenica, con livelli sierici di E₂ che tenderanno a mantenersi medio-bassi, nonché un arresto della maturazione follicolare ed un'alterazione dei meccanismi di selezione del follicolo dominante. In caso, quindi, di somministrazione di dosi eccessive di LH esogeno durante i cicli di ICFM, si osserva la tendenza ad una maturazione ovocitaria accelerata con il conseguente riscontro, al momento della esecuzione della tecnica di riproduzione medicalmente assistita, di ovociti post-

maturi. Queste evidenze hanno spinto verso l'impiego di FSH estrattivo contrassegnato da un grado sempre più elevato di purificazione e quindi di una quota di LH sempre più esigua; l'impiego nella pratica clinica di FSH purificato si è rilevato in grado di garantire un'adeguata maturazione follicolare multipla con l'ottenimento di un soddisfacente numero di ovociti di buona qualità. L'apice di tale evoluzione farmacologia è rappresentato dai preparati, ottenuti grazie all'ingegneria genetica, a base di FSH ricombinante (rFSH) totalmente privi di attività LH.

Sulla base di tali premesse, in donne giovani, normogonadotrope, a buona prognosi, la strategia privilegiata ai fini della ICFM è attualmente rappresentata dal così detto *long protocol* con GnRH-a in associazione col rFSH. In breve, viene somministrato un GnRH-a al fine di desensibilizzare l'asse ipotalamo-ipofisario e, quindi, prevenire dismissioni premature di LH. Una volta instauratasi la desensibilizzazione dell'asse, si procede alla somministrazione di rFSH. Nonostante la stimolazione sia condotta in un ambiente LH privo, la risposta follicolare è adeguata in circa l'85-90% dei casi. In particolare, si ottiene il recupero di almeno 5 ovociti maturi con livelli circolanti di E_2 al picco (giorno dell'hCG) pari a circa 150-200 pg per follicolo >16 mm. L'apparente discrepanza tra i presupposti fisiologici ("*teoria delle due cellule*") e la pratica clinica (ICFM ottimale con il solo impiego di rFSH) è spiegabile sulla base di alcune importanti acquisizioni. In primo luogo, è stato dimostrato che l'LH endogeno è in grado, in presenza di FSH, di elicitarne una biosintesi androgenica massimale, anche se legato soltanto ad una quantità inferiore all'1% dei propri recettori espressi dalle cellule della teca (*sparereceptor hypothesis*) (Chappel e Howles, 1991); le concentrazioni endogene di LH in corso di ciclo spontaneo e finanche i livelli circolanti di ormoni residui alla soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio con analoghi del GnRH sembrerebbero essere sufficienti, nella maggior parte dei casi, ad occupare tale quota recettoriale e, quindi, a sostenere l'attività dell'FSH esogeno.

Sensibilità dell'ovaio alle gonadotropine esogene

In una quota di pazienti oscillante tra il 10 e il 15%, nonostante una normale riserva follicolare, la risposta ovarica all'associazione all'FSH esogeno risulta sub-ottimale (De Placido *et al.*, 2004; Ferraretti *et al.*, 2004). Più specificamente, circa il 30% delle pazienti con risposta sub-ottimale presenta una vera e propria “*poor response*”, caratterizzata da un recupero di un numero di ovociti uguale o inferiore a 3 e/o livelli di E₂ al picco <500 pg/ml). Nel restante 70% dei casi (circa il 10% delle pazienti normogonadotrope) si evidenzia un fenomeno di “*resistenza ovarica*”: a seguito della somministrazione di dosi giornaliere di rFSH appropriate per età e caratteristiche ormonali, si rileva un iniziale reclutamento follicolare. Ciononostante, nell'arco dei successivi 3-4 giorni di stimolazione, la crescita follicolare subisce un “rallentamento” o, addirittura, un arresto. Tale evidenza spinge il clinico ad incrementare progressivamente la dose giornaliera di rFSH. Nella maggior parte dei casi, questa strategia si rivela efficace nel garantire il recupero di almeno 5 ovociti maturi. Il recupero viene, tuttavia, ottenuto al prezzo di un consumo elevato, rispetto a quello atteso, di gonadotropine. Questo quadro caratteristico di risposta ovarica è stato recentemente etichettato come “*hypo-response*” (De Placido *et al.*, 2005). La necessità di definire e opportunamente inquadrare questo sottogruppo di pazienti nasce da alcune considerazioni di ordine pratico e nosologico: si tratta, infatti, di risposte che non rientrano nei criteri classici, sopra menzionati, della “*poor response*” (Surrey *et al.*, 1998), in quanto caratterizzate da livelli di E₂ al picco >500 pg/ml e da un recupero di almeno 5 ovociti. Tuttavia, esse non mostrano neanche i caratteri propri della normale risposta, in quanto contrassegnate dalla necessità di impiego di una dose cumulativa di gonadotropine sensibilmente più elevata rispetto a quella attesa per età e caratteristiche antropometriche. Esistono, inoltre, numerose evidenze, in letteratura, che dimostrano chiaramente come l'impiego di una dose cumulativa di FSH elevata (superiore alle 3500 UI) si associ ad una riduzione della qualità ovocitaria/embrionaria, nonché ad un decremento delle probabilità di concepimento. Da qui l'ipotesi che la “*resistenza ovarica*”, ossia la necessità di impiegare dosi

elevate di FSH e la scarsa prognosi, rappresentino due epifenomeni di una medesima condizione di anomala maturazione follicolo-ovocitaria (De Placido *et al.*, 2001; 2004; 2005; Ferraretti *et al.*, 2004). E' stato prospettato che, alla base di questi caratteristici profili di risposta anomala, vi sia un inadeguato sostegno, da parte dell'LH, della follicologenesi. In altre parole, ossia una condizione di eccessiva carenza di attività LH (quale quella che si ottiene con i GnRH-a) potrebbe riflettersi, in pazienti "predisposte", in una risposta sub-ottimale all'FSH. Questa idea è basata su numerosi studi (Filicori *etal.*, 2003) che dimostrano come l'ormone giochi un ruolo chiave nel coadiuvare l'FSH nel sostegno delle fasi intermedio-tardive della crescita follicolare. Infatti, la somministrazione di LH riduce la durata del trattamento con rFSH e, in dosi opportunamente calibrate, migliora gli stadi finali della stimolazione ovarica, limitando lo sviluppo dei follicoli antrali.

La recente disponibilità di preparati a base di LH ricombinante (rLH) ha reso possibile una più precisa valutazione degli effetti derivanti dalla somministrazione di dosi minime e calibrate di questo ormone in caso di risposta sub-ottimale al GnRH-a "long protocol" associato a monoterapia con rFSH. Dati emersi dai principali studi clinici (De Placido *et al.*, 2001; 2004; 2005; Ferraretti *et al.*, 2004) hanno di fatto dimostrato come, a differenza delle *normal responders*, le pazienti *hypo-responders* traggano vantaggio da una supplementazione con LH esogeno. E' importante sottolineare che tale beneficio sembra essere del tutto indipendente dai livelli di LH endogeno, misurati prima dell'inizio della supplementazione. Questa osservazione sembra consolidare l'idea di una discrepanza tra LH "immunoreattivo" e "bioattivo": la misurazione delle concentrazioni ematiche di LH, infatti, potrebbero fornire una stima non sempre attendibile dell'attività biologica della molecola *in vivo*.

Partendo da questi presupposti, abbiamo ipotizzato che alla base della "*hypo-response*" possa esservi la presenza di un LH biologicamente meno attivo, in grado di sostenere adeguatamente la mono-ovulazione spontanea, ma, al contrario, inadeguato ai fini del supporto di una crescita follicolare multipla FSH indotta. Numerose evidenze suggeriscono come alla base di tale comportamento vi sia una variante del

gene dell'LH. In Italia tale variante presenta una frequenza nella popolazione generale di circa 13-14 %. Si tratta di una molecola caratterizzata da un'emivita più breve e di riflesso da un'attività biologica “*in vivo*” ridotta. In uno studio eseguito in 60 pazienti normogonadotrope sottoposte a rFSH *long protocol* , la frequenza della variante delle pazienti *hypo-responders* è risultata significativamente più elevata rispetto alle normali risponditrici (3.18 *versus* <1%) (Alviggi *et al.*, 2011).

In contrapposizione al fenomeno della “*hypo-response*”, in una percentuale di pazienti pari al 20% si osserva una risposta esuberante alla stimolazione ovarica controllata. Sebbene l'ipersensibilità alle gonadotropine esogene si rifletta nel vantaggio di un maggiore recupero ovocitario, resta la problematica relativa alle complicanze quali la sindrome da iperstimolazione ovarica. La principale causa di “*hyper-response*” è rappresentata dalla sindrome dell'ovaio policistico (PCOS).

La presente tesi è stata incentrata sulle risposte anomale alle gonadotropine esogene, con particolare riferimento alle potenziali cause di “*hypo-*” e “*hyper-response*”. Per le prime, l'attività di ricerca è stata incentrata sul potenziale impatto di variabili ambientali e genetiche. In relazione alle “*hyper-responses*” è stato utilizzato il modello della PCOS.

1. Fertilità ed Ambiente

Nella specie umana la capacità riproduttiva e la conseguente fertilità di coppia tendono progressivamente a decrescere, soprattutto a causa dei numerosi cambiamenti socio-antropologici ed ambientali che si stanno imponendo negli ultimi anni. Numerose stime individuano nel 12 – 15% delle coppie in età fertile una condizione di sterilità, definita, dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (O.M.S.) e dall'American Society for Reproductive Medicine (A.S.R.M.), come l'incapacità di concepire dopo 12 mesi o più di rapporti sessuali non protetti, o dopo 6 mesi in caso di donne di età superiore ai 35 anni.

Il “*fattore ambientale*” ha avuto un ruolo decisivo nell'incremento di tale percentuale. È ormai chiaro come l'aumento dell'industrializzazione ed il conseguente inquinamento ambientale, il sempre maggior utilizzo di prodotti chimici di sintesi, l'esposizione ripetuta a fattori di rischio (piombo, mercurio, solventi, eteri glicolici, pesticidi, cadmio, manganese, stirene, ecc), tanto nell'ambiente di lavoro quanto nell'ambiente domestico, incidano negativamente sulle capacità riproduttive (Bhatt, 2000).

Nel 1997 Smith et al. hanno dimostrato un incremento del rischio di sterilità in donne esposte a solventi organici volatili, polveri chimiche, pesticidi e radiazioni da schermi di pc. In particolare lo studio evidenziava un alto rischio di sterilità da causa tubarica e di endometriosi in associazione all'esposizione a solventi e polveri [solventi: *odds ratio* (OR), 1.95; limiti di confidenza (CI), 1.08 - 3.52; polveri: OR, 2.87; CI, 1.05 - 7.88]; un alto rischio di sterilità da causa ovulatoria in associazione all'esposizione a solventi (OR, 1.75; CI, 1.03 - 2.98), polveri (OR, 3.00; CI, 1.19 - 7.52) o pesticidi (OR, 3.82; 1.28 - 11.42).

Diversi autori hanno rivolto la loro attenzione all'associazione tra inquinamento ambientale e caratteristiche del seme maschile. Carlsen et al. hanno pubblicato nel 1992 un meta-analisi di tutti i lavori prodotti negli ultimi cinquanta anni: valutando circa 14.000 eiaculati di uomini in età fertile, sono giunti alla conclusione che la conta spermatica è diminuita da circa 113 milioni per cc nel 1938, a circa 66 milioni

per cc nel 1990, in associazione alla diminuzione dell'intero eiaculato. Analoga analisi è stata condotta in Italia dove si è evidenziato una diminuzione della conta spermatica da 88 milioni per ml nel 1981, a 61 milioni per ml nel 1995 con una riduzione del 30,7%, associata ad una riduzione della motilità complessiva dal 74 al 66% e ad una riduzione della normale morfologia dal 76 al 63% (Bilotta et al., 1999). Nonostante molti autori abbiano confermato queste osservazioni (Sharpe et al., 1993; Cohen et al., 1994, Joffe et al., 1996), esistono in letteratura linee di evidenza controverse (Olson et al., 1996; Fish et al., 1996; Paulsen et al., 1996; Handelsman et al., 1997).

Ruolo ancora incerto e tuttora da definire spetta al benzene, noto cancerogeno chimico, sempre più diffuso nell'ecosistema in relazione ai processi di combustione dai quali deriva.

1.1 BENZENE

Definizione e caratteristiche chimiche

Il **benzene** (o benzolo) è un idrocarburo aromatico. A temperatura ambiente è un liquido incolore dal caratteristico odore aromatico pungente, volatile, infiammabile, poco solubile in acqua (1,77 g/l a 20°C) e completamente miscibile con i solventi organici (tabella 1).

Tabella 1.1. *Caratteristiche chimico-fisiche del benzene*

Punto di ebollizione: 80°C	Densità relativa della miscela aria/vapore a 20°C
Punto di fusione: 6°C	(aria=1): 1.2
Densità relativa (acqua=1): 0.88	Punto di infiammabilità: -11°C c.c.
Solubilità in acqua, g/dl a 25°C: 0.18	Temperatura di auto-accensione: 498°C
Tensione di vapore, kPa a 20°C: 10	Limiti di esplosività, vol % in aria: 1.2-8.0
Densità di vapore relativa: 2.7	Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua Pow: 2.13

La formula di struttura del benzene si deve al chimico tedesco Friedrich August Kekulé von Stradonitz ([Darmstadt, 7 settembre 1829](#) – [Bonn, 13 luglio 1896](#)). Kekulé affermò che la struttura del benzene gli era stata ispirata in sogno da un serpente che si mordeva la coda. Ciò gli suggerì la soluzione per risolvere l'enigma della struttura ciclica esagonale del benzene. Purtroppo questa storia è solo una leggenda. Nel [1984](#) i biochimici [John Wotiz](#), dell'Università dell'[Illinois](#), e [Susanna Rudofsky](#), dell'Università di [Chicago](#), scoprirono una lettera in cui Kekulé faceva cenno al chimico francese A. Laurent che proponeva per il cloruro di benzoile una formula di struttura esagonale. Quando nel 1856 Kekulé rese pubblica la formula, in realtà già la conosceva da 12 anni.

La chimica del benzene è C_6H_6 : è una molecola planare, in cui i sei atomi di carbonio hanno ibridazione sp^2 e sono disposti ai vertici di un esagono regolare. Ad ognuno di essi è legato un atomo di idrogeno con cui formano un legame σ , impegnando così tre dei suoi quattro elettroni spaiati. Il quarto elettrone spaiato si trova nell'orbitale p non coinvolto nell'ibridazione ed orientato perpendicolarmente al piano della molecola; la fusione dei sei orbitali p produce un *anello aromatico* che lega tutti gli atomi coinvolti (figura 1):

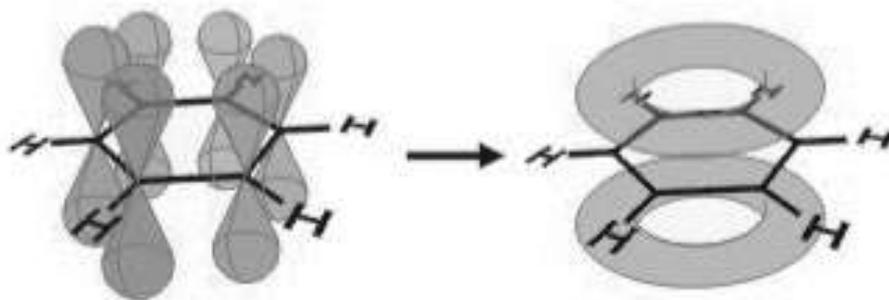
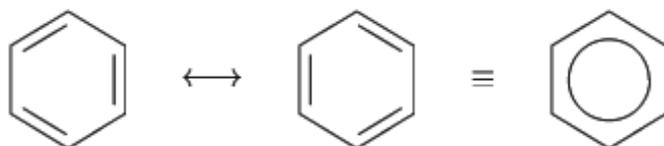


Figura 1.1. *Rappresentazione grafica della struttura planare del benzene*

La lunghezza del legame C-C è 1,39 Å, intermedia tra quella tipica di un legame singolo (1,54 Å) e quella tipica di un legame doppio (1,33 Å). Questo tipo di delocalizzazione – un orbitale esteso a più atomi giacenti su un piano attraverso cui vengono condivisi $4n + 2$ elettroni (con n intero positivo) – viene detto **aromaticità**. La struttura del benzene si pone a metà tra quella di due "cicloesatrieni" equivalenti. Si dice che è un *ibrido di risonanza* tra due *formule limite*:



Farmacocinetica

Assorbimento

Il benzene è rapidamente assorbito attraverso l'apparato respiratorio e gastrointestinale. Anche l'assorbimento attraverso la cute è rapido, sebbene quantitativamente inferiore a causa della rapida evaporazione.

L'inalazione di una dose di 160 - 320 mg/m³ (50 - 100 ppm) determina un assorbimento del 50% ed una ritenzione della dose inalata del 30%. L'assorbimento respiratorio, corrispondente circa al 50% della dose, è massimo nei primi 5 minuti d'esposizione (70 - 80%), per poi declinare nei successivi 15 minuti e variare tra il 20 e il 60% dopo 1 ora e tra il 20 ed il 50% dopo 2 ore di esposizione (Srbova et al., 1950). La riduzione dell'assorbimento registrato all'aumentare del tempo di esposizione è dovuto all'escrezione di benzene non metabolizzato attraverso l'aria

espirata: ciò sta ad indicare come il metabolismo del benzene sia saturato a concentrazioni superiori alle 10ppm (32 mg/m³) (Nomiyama e Nomiyama, 1974; Pekari et al., 1992; Yu e Weisel, 1998).

Il benzene è quasi completamente assorbito attraverso il tratto gastrointestinale: l'assorbimento orale del benzene a partire da soluzioni acquose è quasi vicino al 100% anche se la presenza di cibo nello stomaco potrebbe ridurre tale percentuale. Il benzene è, infatti, rapidamente e completamente assorbito da soluzioni acquose in misura tale da raggiungere il picco di concentrazione nel sangue dopo circa 1 ora (Morgan et al., 1991).

La percentuale di assorbimento in seguito ad esposizione cutanea è inferiore al 1% della dose applicata, valore sicuramente sottostimato nelle situazioni di contatto di lunga durata. Tale percentuale aumenta linearmente all'incrementare della dose.

Distribuzione

Il benzene è rapidamente distribuito attraverso il corpo umano indipendentemente dalla via d'assorbimento, concentrandosi in particolar modo nel tessuto adiposo per le sue caratteristiche lipofile. La quantità di benzene presente in un tessuto è direttamente proporzionale al suo grado di perfusione.

Low et al. (1989, 1995) hanno individuato le concentrazioni più alte di benzene, in seguito ad esposizione orale, nel fegato e nei reni; concentrazioni intermedie nel sangue; concentrazioni più basse nelle cavità nasali, nella cavità orale, nella ghiandola mammaria e nel midollo osseo. Schrenk et al., nel 1941 hanno dimostrato in studi su test animali come la concentrazione del benzene individuata negli eritrociti è risultata essere quasi il doppio di quella riscontrata nel plasma. Studi su topi hanno inoltre evidenziato come il benzene possa superare la barriera placentare raggiungendo il feto già dopo un'ora dall'avvenuta esposizione (Ghantous e Danielsson, 1986).

Metabolismo (figura 2)

Nonostante non ne sia stato del tutto compreso il ruolo, il metabolismo svolge un ruolo essenziale nella tossicità del benzene. È infatti chiaro che gli effetti tossici del benzene sono collegati ai suoi metabolici e alle interazioni che tra questi si vengono a creare (ATSDR, 1997; Snyder et al., 1993b; Snyder e Hedii, 1996; Ross, 1996; Witz et al., 1996).

Il primo passaggio nel metabolismo del benzene è rappresentato dalla formazione di *eossido* e *ossido di benzene*, reazioni catalizzate dal citocromo P450 2E1 (CYP2E1). L'ossido di benzene è successivamente convertito, attraverso una reazione non enzimatica, in *fenolo*, principale prodotto del metabolismo iniziale del benzene. In alternativa, l'ossido di benzene può reagire con il glutatione (GSH) per formare l'*acido fenilmercapturico*; può subire conversione enzimatica ad opera dell'eossido idrolisi con formazione di *catecolo*; può subire una reazione catalizzata dal ferro con la formazione prima di *trans, trans-muconaldeide*, in un processo saturabile, e poi di *acidotrans, trans-muconico* (MA).

Il fenolo è quindi successivamente ossidato a *idrochinone* ad opera del CYP2E1. La successiva ossidazione dell'idrochinone a *p-benzoquinone* è catalizzata dalla mieloperossidasi (MPO) attraverso una reazione saturabile (Smith et al., 1989).

Tutti i composti fenolici possono essere coniugati con acido solfato o acido glucuronico. I prodotti di coniugazione del fenolo e dell'idrochinone rappresentano la maggior parte dei metaboliti eliminati con le urine (Sabourin et al., 1989; Wells e Nerland, 1991).

Mentre la reazione di ossidazione del benzene a fenolo avviene nel fegato, le successive reazioni avvengono nei tessuti bersaglio. Il pathway metabolico è uguale nelle varie specie.

L'enzima CYP2E1, in seguito ad esposizione al benzene, va incontro ad un processo di induzione da cui consegue un aumento della formazione di metaboliti tossici. L'attività di tale enzima è infatti fondamentale per l'espressione del potere tossico del

benzene (Valentine et al., 1996). Anche l'etanolo e l'anilina, così come fenolo, idrochinone, benzoquinone e catecolo possono determinare induzione di CYP2E1 con conseguente aumento dei metaboliti idrolizzati del benzene (Chepiga et al., 1990; Parke, 1989; Snyder et al., 1993a). Il metabolismo del benzene è altresì inibito dal toluene che determina, così, una riduzione significativa della tossicità (Andrews et al., 1977).

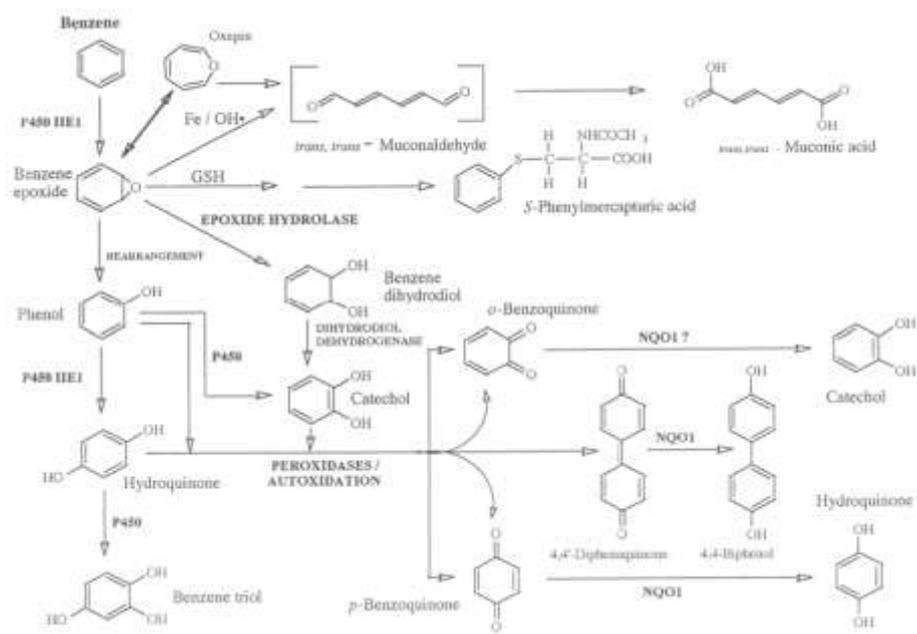


Figura 1.2. *Metabolismo del benzene*

Eliminazione

L'eliminazione del benzene è caratterizzata dall'escrezione di composti non metabolizzati attraverso l'aria espirata, e di metaboliti attraverso le urine. L'escrezione urinaria è quantitativamente più significativa rispetto alle altre comuni vie di eliminazione (Sherwood, 1988).

A basse dosi (10 mg/kg) l'escrezione urinaria rappresenta la quota maggiore di eliminazione. Idrochinone glucoronide (40%), fenil sulfato (28%) e MA (15%) rappresentano i metaboliti più significativi a queste dosi. Alla dose di 200 mg/kg, l'escrezione urinaria corrisponde al 42 - 47% della dose assorbita, per poi decrescere a scapito di un aumento della quota di escrezione respiratoria di composti

volatili (46 - 56% della dose assorbita). L'eliminazione attraverso le feci, che ammonta allo 0,5 - 3% della dose assorbita, è minore sebbene costante e indipendente dalla dose assorbita (McMahon e Birnbaum, 1991).

L'emivita del benzene nell'uomo è di circa 48 ore sebbene vi siano differenze interindividuali correlate all'età. Vi sono, inoltre, differenze nelle cinetiche di eliminazioni tra il sesso maschile e quello femminile: appare evidente come nelle donne la cinetica di eliminazione sia più lenta a causa di una maggiore composizione in tessuto adiposo del peso corporeo (Sato et al., 1975).

Origine e produzione

Il benzene fu scoperto nel 1825 dall'inglese Michael Faraday che lo isolò dal petrolio e lo chiamò *bicarbuo di idrogeno*. Nel 1833 il chimico tedesco Eilhard Mitscherlich lo sintetizzò per distillazione dell'acido benzoico con la calce viva. Mitscherlich lo chiamò *benzino*. Nel 1845 il chimico inglese Charles Mansfield, lavorando per August Wilhelm von Hofmann, isolò il benzene dal catrame. Quattro anni dopo Mansfield avviò la prima produzione industriale del benzene usando il catrame come materia prima.

Il benzene presente nell'ambiente deriva sia da processi naturali che da attività umane. Le fonti naturali forniscono un contributo relativamente esiguo rispetto a quelle antropogeniche e sono dovute essenzialmente alle emissioni vulcaniche, agli incendi boschivi o alla combustione incompleta di materiali ricchi di carbonio a temperature superiori ai 500° C.

La maggior parte del benzene presente nell'aria è invece un sottoprodotto delle attività umane. Fino alla seconda guerra mondiale il benzene era principalmente un sottoprodotto della distillazione del carbone per la produzione del coke destinato alle acciaierie. Tuttavia negli anni '50 l'aumentata richiesta di benzene, da parte di un'industria delle materie plastiche in piena crescita, portò alla messa a punto di processi di produzione a partire dal petrolio. Oggi la maggior parte del benzene proviene dall'industria petrolchimica; solo una piccola parte deriva dal carbone. Sono

tre i processi industriali che concorrono grossomodo in parti uguali alla produzione del benzene: il *reforming* catalitico, l'*idro-dealchilazione* del toluene e lo *steam cracking*.

1. Nel *reforming* catalitico una miscela di idrocarburi aventi punto di ebollizione compreso tra 60 °C e 200 °C viene mescolata con idrogeno ed esposta ad un catalizzatore a base di cloruro di platino o di cloruro di renio ad una temperatura di 500 – 525 °C e ad una pressione variabile tra le 8 e le 50 atmosfere. In queste condizioni gli idrocarburi alifatici ciclizzano (si chiudono ad anello) e perdono idrogeno, diventando idrocarburi aromatici. I prodotti vengono separati dalla miscela di reazione per estrazione con un opportuno solvente (ad esempio glicol dietilenico o solfolano); il benzene è quindi isolato dalla miscela dei prodotti per distillazione.

2. L'*idro-dealchilazione* è una reazione che converte il toluene in benzene. In questo processo il toluene viene miscelato con l'idrogeno e fatto passare su un catalizzatore a base di ossido di cromo, molibdeno o platino ad una temperatura di 500 – 600 °C e ad una pressione di 40 - 60 atmosfere. In alcuni casi non si utilizza alcun catalizzatore, ma si opera a temperature superiori. In queste condizioni il toluene subisce una *dealchilazione* rappresentata dalla reazione $C_6H_5CH_3 + H_2 \rightarrow C_6H_6 + CH_4$. La resa del processo è generalmente del 95%. Spesso il toluene viene sostituito dallo xylene o da altri idrocarburi aromatici più pesanti con analoga efficienza.

3. Lo *steam cracking* è un processo impiegato per produrre etilene ed altre olefine a partire da idrocarburi alifatici. A seconda della miscela usata come materia prima nella produzione delle olefine, lo *steam cracking* può produrre un liquido ricco di benzene noto come *benzina di pirolisi*. Questa può essere miscelata con altri idrocarburi per essere quindi usata come additivo per la benzina o separata per distillazione nei suoi componenti, tra i quali il benzene.

Attualmente la produzione mondiale di benzene è stimata essere approssimativamente di 15 milioni di tonnellate (13.6×10^6 metric tons) (Fishbein, 1992). La sola produzione di benzene negli Stati Uniti aumenta di un tasso del 3% l'anno (ATSDR, 1996), passando da una produzione di circa 6 milioni di tonnellate nel 1990 (5.4×10^6 metric tons) a circa 14.0 milioni nel 1993 (Fishbein, 1992).

Sorgenti

La maggior fonte emissiva di benzene è costituita dai gas di scarico dei veicoli a motore, alimentati con benzina (principalmente auto e ciclomotori), essendo presente come antidetonante nelle benzine “verdi”. Il benzene rilasciato dai veicoli deriva dalla frazione di carburante incombusto, da reazioni di trasformazione di altri idrocarburi e, in parte, anche dall'evaporazione che si verifica durante la preparazione, la distribuzione e lo stoccaggio delle benzine, ivi comprese le fasi di marcia e sosta prolungata dei veicoli. Alcune stime effettuate a livello di Unione Europea attribuiscono a questa categoria di veicoli più del 70% del totale delle emissioni di benzene. Negli ambienti chiusi, il contributo maggiore all'esposizione è attribuibile al fumo di tabacco (tabella 2).

Tabella 1.2. *Concentrazioni di benzene in diversi ambienti (Powell and Tucker, 1986; USEPA, 1987; Shah and Singh, 1988; ATSDR, 1996).*

Location of Air Sample	Level (ppb: parts per billion)
Urban	4.0-160
Remote/Rural	0.16-3.5
Suburban residential-remote from traffic	1.8-4.5
Indoor	1.8
Workplace	2.1
Near chemical plant	14.0
Near refineries	9.0
Gas stations	<1.0-32

La presenza di benzene in atmosfera è un problema particolarmente rilevante nelle aree urbane, dove insistono densità abitative elevate e notevoli quantità di traffico veicolare. In queste aree la quantità predominante di benzene (circa 85%) deriva dai gas di scarico dei veicoli mentre una percentuale minore (15%) proviene dalle emissioni evaporative. La dispersione del benzene in atmosfera è connessa a una serie di variabili di tipo meteorologico (variazioni stagionali e giornaliere), socio-economico (intensità e fluidità del traffico giornaliero e orario) e geografico (distribuzione degli assi stradali principali, morfologia del territorio, ecc.).



Figura 1.3. *Sorgenti di emissione e di esposizione al benzene*

Nella figura 3 si mostrano i risultati di uno studio realizzato negli USA nel 1998 dove vengono evidenziati i rapporti percentuali tra sorgenti di esposizione e sorgente di emissione di benzene. La sorgente di emissione prevalente (traffico) contribuisce solo in parte all'esposizione, che invece sembra essere sostanzialmente legata al fumo di sigaretta e alle attività individuali, soprattutto quelle condotte in ambito domestico. Si nota infatti come circa il 50% dell'esposizione a benzene è dovuta al fumo di tabacco (mentre i gas esausti delle auto e le emissioni industriali contribuiscono al 20% circa). Un fumatore medio (20 sigarette al giorno) assorbe circa 1,8 mg di benzene al giorno. Questo valore è circa 10 volte quello assorbito mediamente da un non fumatore.

Da non sottovalutare è la possibile esposizione al benzene in seguito all'assunzione di cibi o bevande contaminate (tabella 3).

Tabella 1.3. *Alimenti contaminati dal benzene (Powell and Tucker, 1986; Lee et al., 1983; Marcus, 1987; Thomas, 1986).*

Foods Containing Benzene (level in µg/kg)		
<u>Vegetables:</u>	<u>Fruits:</u>	<u>Meat, Fish, and Poultry:</u>
Dry red beans	Apple	Cooked beef (2-19)
Leek	Citrus fruit	Irradiated beef (19)
Mushroom	Cranberry and bilberry	Cooked chicken (<10)
Onion, <i>roasted</i>	Black currants	Egg, hard-boiled (500-1900)
Parsley	Guava	Egg, uncooked (2100)
Potato, <i>cooked peel</i>	Cayenne pineapple	Haddock fillet (100 to 200)
Soybean milk	Strawberry (trace)	Lamb, heated (<10)
Trassi, <i>cooked</i>	Tomato, <i>hothouse</i>	Mutton, heated (<10)
<u>Beverages:</u>	<u>Dairyproducts:</u>	Veal, heated (<10)
Cocoa	Butter (0.5)	Codfish
Coffee	Blue cheese	<u>Nuts:</u>
Jamaican rum (120)	Cheddar cheese	Filbert, <i>roasted</i>
Tea	Other cheese	Peanut, <i>roasted</i>
Whiskey		Macadamia nut

Utilizzi

Fino agli anni '20 il benzene fu usato spesso come solvente industriale, in special modo per sgrassare le superfici metalliche. Col crescere della consapevolezza della sua pericolosità è stato sostituito da altri solventi nelle applicazioni che comportano un'esposizione diretta. Come additivo per la benzina, il benzene agisce come antidetonante aumentandone il numero di ottano. Negli Stati Uniti, come pure in Europa, per via dei suoi effetti deleteri sulla salute, le autorità hanno posto il limite del contenuto di benzene nella benzina all'1% in volume. Il maggiore utilizzo del

benzene è tuttavia quello di intermedio per la produzione di altre sostanze chimiche. I composti più importanti, in termine di quantità, prodotti dal benzene sono lo *stirene*, materia prima per la produzione di polimeri, l'*acido tereftalico*, materia prima per il polietilene, il *fenolo* (attraverso il cumene) ed il *cicloesano*, utilizzato nella sintesi dei nylon. Minori quantità di benzene vengono impiegate per produrre gomme, lubrificanti, coloranti, detergenti, farmaci, esplosivi e pesticidi.

Legislazione

A causa della accertata cancerogenicità di questo composto, lo IARC (International agency for research on cancer) lo ha classificato nel gruppo 1 dei cancerogeni per l'uomo e pertanto non è possibile raccomandare una soglia di sicurezza per la sua concentrazione in aria. L'esposizione a questa sostanza deve essere ridotta al massimo. A tal proposito il legislatore italiano ha introdotto severi limiti attraverso il DM 60 del 2 aprile 2002:

Limite	Periodo di riferimento	Indicatore statistico	Valore di riferimento	Superamenti concessi	Data per il rispetto del limite	Margine di tolleranza	Soglia di valutazione superiore	Soglia di valutazione inferiore
Valore limite per la protezione umana della salute	anno civile	Media	5 µg/m ³	-	1 gennaio 2010	6 µg/m ³ (100%)	3,5 µg/m ³	2 µg/m ³

Il D.M. 60/2002 stabilisce un limite annuo, che diminuirà progressivamente fino al 2010, per la media registrata nell'arco dei dodici mesi:

2006	2007	2008	2009	2010
9 µg/m ³	8 µg/m ³	7 µg/m ³	6 µg/m ³	5 µg/m ³

Il DM n. 163 del 21 aprile 1999 individua i criteri ambientali e sanitari in base ai quali i Sindaci possono limitare la circolazione degli autoveicoli per migliorare la qualità dell'aria nelle aree urbane.

Il Decreto Legislativo n. 413 del 4 novembre 1997 impone una quantità massima di benzene e di idrocarburi aromatici totali nelle benzine pari rispettivamente all'1% e al 40% in volume.

Il limite di sicurezza per i lavoratori esposti al benzene, come TLV-TWA, è di 0,5 ppm, pari a 1,6 mg/mc; come TLV-STEL è di 2,5 ppm, pari a 8 mg/mc (limiti indicati dall'ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists).

Meccanismi di tossicità

Gli effetti tossici che compaiono in seguito all'esposizione al benzene non sono attribuibili tanto all'idrocarburo aromatico in sé, quanto ai suoi metaboliti ed in particolare a catecolo, idroquinone, *p*-benzoquinone, MA ed epossido di benzene.

I metaboliti del benzene formano addotti covalenti con proteine e DNA (Lutz e Schlatter, 1997): tale processo segue una cinetica lineare a basse dosi di benzene, processo che va incontro a saturazione ad alte concentrazioni (Mazzullo et al. 1989). In particolare il legame dell'idroquinone o del *p*-benzoquinone ai gruppi solfidrici dei siti attivi delle proteine potrebbe essere responsabile degli effetti genotossici del benzene. L'idroquinone e il *p*-benzoquinone interferiscono con il legame della guanosina trifosfato (GTP) alla tubulina attraverso l'alchilazione dei gruppi solfidrici nucleofili, processo richiesto per la stabilizzazione della polimerizzazione della tubulina durante la formazione dei microtubuli in mitosi (Iron e Neptun, 1980; Pfeifer e Irons, 1983). L'associazione tra esposizione al benzene e la comparsa di aberrazioni cromosomiche strutturali e numerarie in linfociti umani suggeriscono come il benzene possa essere considerato un agente clastogenico. Numerosi metaboliti del benzene hanno mostrato di inibire l'attività della topoisomerasi II (figura 4), azione responsabile della comparsa di effetti clastogenici osservati durante l'esposizione al benzene (Frantz et al., 1996). In particolar modo il *p*-benzoquinone e la muconaldeide (MUC) inibiscono direttamente la topoisomerasi II a concentrazioni inferiori ai 10µM. Anche i fenoli, i catecoli, l'idroquinone ed il 1,2,4-benzenetriolo hanno

mostrato di inibire questo enzima fondamentale per il processo di replicazione del DNA.

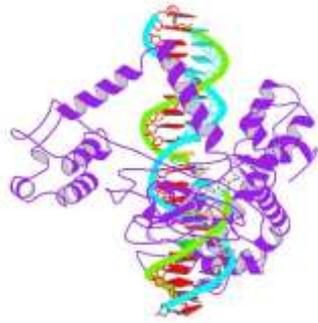


Figura 1.4. *Struttura cristallografica della Topoisomerasi II associata ad un frammento di DNA*

I metaboliti del benzene sono inoltre responsabili degli effetti genotossici attribuiti a tale sostanza, effetti che si manifestano attraverso l'alterazione della progressione del ciclo cellulare e della sintesi di RNA e DNA (Forni e Moreo, 1967).

Il benzene può inoltre produrre stress ossidativi nei tessuti bersaglio. Il *p*-benzoquinone è altamente reattivo e può determinare deplezione dei livelli cellulari di GSH (Brunmark e Cadenas, 1988).

I metaboliti del benzene sono anche coinvolti in cicli redox, che determinano la produzione di specie reattive dell'ossigeno che possono, a loro volta, reagire con componenti macromolecolari (Rao e Snyder, 1995).

Il benzene ed i suoi metaboliti sono responsabili di alterazioni nella sintesi di IL-1, citochina fondamentale nel processo di ematopoiesi (Renz and Kalf 1991). L'IL-1 attiva, infatti, la produzione da parte dei fibroblasti stromali di CSF (colony-stimulating factor), citochina coinvolta nella differenziazione delle cellule staminali. La riduzione della cellularità midollare, caratteristica dell'esposizione al benzene, potrebbe infatti dipendere dall'incapacità dei macrofagi stromali di processare la pre-IL-1 α ad IL-1 α matura. Il *p*-benzoquinone determina un'inibizione concentrazione-dipendente della CALPAIN piastrinica, proteasi calcio-attivata, cisteina-dipendente, che catalizza la processazione della pre-IL-1 α nella forma matura. Il *p*-benzoquinone

inibisce, inoltre, la processazione dell'IL-1 β a IL-1 ad opera dell'IL-1 β convertasi, proteasi solfidrico-dipendente (Niculescu et al., 1995, 1996).

Effetti tossici (figura 5)

	Death	Acute	Intermediate	Chronic	Immunologic/Lymphoretic	Neurologic	Reproductive	Developmental	Genotoxic	Cancer
Inhalation	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Oral	●	●	●		●					●
Dermal	●	●								

Human

Figura 1.5. *Informazioni esistenti in letteratura circa gli effetti tossici del benzene*

Ematotossicità

Numerose evidenze circa l'azione ematotossica esercitata dal benzene individuano nell'esposizione a questo idrocarburo l'eziologia dell'anemia aplastica e della pancitopenia riscontrata in numerosi soggetti esposti in ambiente di lavoro ai vapori del gasolio, al fumo di tabacco o alle emissioni di automobili (Goldstein, 1988).

Appare ormai chiaro come, in seguito all'esposizione al benzene, siano a maggior rischio di alterazioni le cellule staminali rapidamente proliferanti. Per tale motivo il benzene esercita la propria azione tossica soprattutto sul midollo osseo (OMS, 1993).

L'esposizione al benzene determina, infatti, depressione del midollo osseo con successiva comparsa di anemia, leucopenia e trombocitopenia. L'associazione di queste condizioni in aggiunta alla necrosi del midollo osseo configura il quadro dell'anemia aplastica. Pazienti affetti da tale condizione presentano inoltre bilirubinemia moderata, cambiamenti nella resistenza osmotica degli eritrociti, riduzione della vita media eritrocitaria, aumento del livello di urobilinogeno fecale, reticolocitosi moderata. È stata inoltre osservata la riduzione della resistenza

osmotica nei leucociti, della funzione fagocitaria dei neutrofili, delle riserve di glicogeno, dell'attività delle perossidasi neutrofile; aumento dell'attività dell'acido delta-aminolevulinico negli eritrociti e delle coproporfirine nelle urine (Aksoy, 1991).

Effetti immunologici

L'esposizione a benzene, toluene e xylene è stata associata alla riduzione dei livelli di agglutinine e delle immunoglobuline IgG e IgA e ad un aumento dei livelli di IgM. È stata inoltre osservata in lavoratori esposti ad alte dosi di benzene una riduzione del numero dei leucociti e dei linfociti T (OMS, 1993).

Effetti genotossici

Numerosi studi effettuati in lavoratori esposti al benzene hanno mostrato aberrazioni cromosomiche numeriche e strutturali (Ding et al., 1983; Sasiadek et al., 1989; Yardley-Jones et al., 1990; Major et al., 1992; Eastmond, 1993; Tompa et al., 1994). Tali effetti si sono resi evidenti alla dose di 320 mg/m³(100 ppm) , sebbene in molti studi sono stati riportati alterazioni cromosomiche alla dose di 32 mg/m³ (10 ppm) (OMS, 1993; Major et al., 1994; Karacic et al., 1995). I risultati dimostrano come il benzene possa indurre duplicazioni geniche attraverso meccanismi di ricombinazione ma non inattivazioni geniche come conseguenza di mutazioni o delezioni (Rothman et al., 1995).

Carcinogenicità

Il benzene è una sostanza classificata:

- ✓ dalla Comunità Europea come cancerogeno di categoria 1, R45;
- ✓ dalla I.A.R.C. (International Agency for Research on Cancer) nel gruppo 1 (sostanze per le quali esiste un'accertata evidenza in relazione all'induzione di tumori nell'uomo);
- ✓ dalla A.C.G.I.H. (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) in classe A1 (cancerogeno accertato per l'uomo) (figura 6).

L'esposizione prolungata al benzene può determinare, infatti, la comparsa di leucemia. Il cancro indotto dall'esposizione ad agenti tumorali, come il benzene, generalmente ha tempi di latenza compresi tra i 15 ed i 30 anni. È da evidenziare come, nel processo di carcinogenesi, esista una relazione dose-effetto per cui ad esposizioni a dosi sempre più alte corrisponda una probabilità maggiore di sviluppare un tumore. Stime dell'EPA e dell'OMS indicano da 4 a 10 casi aggiuntivi di leucemia per milione di persone esposte alla concentrazione di $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ di benzene per tutta la vita. In particolare è stata dimostrata un aumento dell'incidenza di leucemia mieloide acuta (AML).

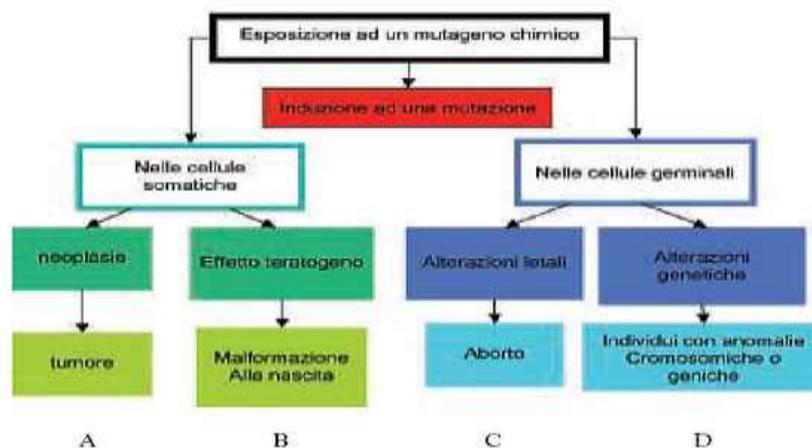


Figura 1.1 - Effetti dell'esposizione ad un mutageno chimico.

Figura 1.6. *Effetti all'esposizione ad un mutageno chimico*

Nello studio "Pliofilm cohort" Rinsky et al. (tabella 4) hanno dimostrato una relazione tra esposizione cumulativa al benzene e rischio di leucemia: un'esposizione occupazionale alla dose di $3,2 \text{ mg}/\text{m}^3$ (1 ppm) per 40 anni è associata ad un rischio (odds ratio) di 1,7. Brett et al., hanno stimato un rischio leggermente inferiore evidenziando 0.5 - 1.6 eccessi di casi di leucemia su 1000 lavoratori esposti al benzene, rispetto ai 5.3 casi di Rinsky et al. Paxton et al. hanno evidenziato 0.26 -

1.3 eccessi di casi di leucemia su 1.000 lavoratori esposti alla dose di 3,2 mg/m³ (1 ppm) per 40 anni .

Table 1. Published leukaemia risk estimates for the Plioform cohort at two benzene exposure levels

Cases per 1000 workers exposed to:		Exposure matrix	Reference
3.2 mg/m ³ (1 ppm)	0.32 mg/m ³ (0.1 ppm)		
5.3	–	Rinsky et al. (79)	Brett et al. (82)
0.5–1.6	–	Rinsky et al. (79) Crump & Allen (87)	Brett et al. (82)
1.3	0.12	Rinsky et al. (79)	Paxton et al. (81, 83)
0.26	0.026	Crump & Allen (87)	Paxton et al. (81, 83)
0.49	0.048	Paustenbach et al. (88)	Paxton et al. (81, 83)

Numerose metanalisi hanno mostrato un significativo incremento di mortalità per leucemia nei soggetti addetti alla guida di autocisterne (Rushton, 1993), e nei lavoratori dell'industria petrolifera (Schwartz, 1987). Non è stata invece individuato un aumento di rischio di leucemia nei lavoratori impegnati nella produzione del benzene o dei suoi sottoprodotti (Hurley et al., 1991; Swaen et al., 1991).

Neurotossicità

Il benzene può determinare affezioni sia del sistema nervoso centrale che di quello periferico. L'inalazione acuta di alte dosi di benzene può essere responsabile della comparsa di sintomi di neurotossicità (Snyder, 1987). Il benzene può determinare la comparsa di sintomi generici come senso di vertigine, mal di testa e vertigine alla dose di 799 – 9.584 mg/m³ (250 – 3.000 ppm) (Brief et al., 1980); sonnolenza, tremori, delirio e perdita di coscienza alla dose di 2.236 – 9.583 mg/m³ (700- 3.000 pm) (ATSDR, 1997). L'esposizione prolungata per 5 - 10 minuti alla dose di 63.894 mg/m³ (20.000 ppm) può determinare l'exitus (Sandmeyer, 1981). Questi sintomi sono tutti reversibili attraverso l'allontanamento dalla fonte di esposizione (Kraut et al., 1988).

Il prevalere dell'uno o dell'altro effetto tossico in seguito all'esposizione al benzene dipende fondamentalmente dal tempo di esposizione.

Gli **effetti tossici acuti** sono in genere dovuti a contatto per inalazione o per via cutanea e si presentano per lo più a causa di fughe o versamenti in ambienti di lavoro. Brevi esposizioni di 5-10 minuti a livelli molto alti di benzene nell'aria (10.000 - 20.000 ppm) possono condurre alla morte. Livelli superiori alle 20.000 ppm possono determinare edema polmonare, polmonite ab ingestis, infiammazione emorragica severa dei polmoni e insufficienza polmonare. Livelli di concentrazione più bassi (700 - 3.000 ppm) possono causare vertigini, sonnolenza, tachicardia, tremori, irritazione oculare, offuscamento visivo, dolore o ustione oculare, confusione e perdita di coscienza. A concentrazioni superiori alle 1.000 ppm può determinare la comparsa di aritmie fatali. Concentrazioni minori ma più prolungate nel tempo possono alterare la memoria e alcune capacità psichiche. Il benzene è anche responsabile di disturbi e di un effetto irritante sulla pelle e sulle mucose (oculare e respiratoria in particolare) dove determina la comparsa di eritema, bruciore, edema e rigonfiamento.

L'ingestione di cibi e bevande che contengono alti livelli di benzene possono causare vomito, irritazione allo stomaco, vertigini, sonnolenza, convulsioni, tachicardia, coma e morte. Il recupero da esposizione moderata a benzene può richiedere 1 - 4 settimane. Durante questo tempo, i pazienti possono continuare ad avvertire irritabilità e dispnea. L'interessamento cardiaco e la colorazione gialla della cute possono persistere fino ad un mese.

Gli **effetti tossici cronici** sono invece dovuti a periodi di esposizione molto lunghi e a basse concentrazioni. Gli effetti si manifestano solitamente in funzione delle dosi di benzene alle quali il soggetto è stato esposto, e possono variare dalla semplice anemia fino al grave quadro della pancitopenia. L'affezione che preoccupa di più, sia a livello professionale che ambientale, è la comparsa di leucemia dovuta all'esposizione ripetuta a basse concentrazioni di benzene per più decine di anni.

L'esposizione al benzene è stata anche collegata a danno cromosomico e a danno a carico degli organi riproduttivi.

1.2. Benzene ed effetti riproduttivi

Numerosi studi hanno indagato gli effetti tossici derivanti dall'esposizione al benzene sull'apparato riproduttivo umano. Già nel 1946 Vara e Kinnunen mostrarono come in 30 donne con sintomi da esposizione al benzene vi fosse un'augmentata incidenza di menorragia, oligomenorrea, sterilità, ipoplasia e degenerazione ovarica. Essi evidenziarono in oltre come tali alterazioni fossero più severe nelle pazienti prossime alla menopausa.

Successivamente Pushkina et al. (1968), valutando un gruppo di lavoratrice con ipofunzione ovarica correlata con l'esposizione al benzene, evidenziarono come tali donne mostrassero livelli di acido ascorbico nel sangue inferiori rispetto a lavoratrici in buono stato di salute ($p < 0.001$).

Mukhametova e Vozovaya nel 1972 esaminando 360 donne esposte a concentrazioni di benzene $< 5 \text{ mg/m}^3$ notarono un aumento dei casi di disturbi funzionali del ciclo mestruale associati, nelle donne esposte a concentrazioni maggiori, a maggiori tassi di interruzione prematura di gravidanza, rottura di placenta e asfissia intrauterina del feto.

Yin et al. (1987) in uno studio condotto su 174 lavoratrici esposte a benzene, toluene o ad un mix delle due sostanze evidenziarono un aumento dei casi di menorragia, effetto non dose dipendente ($p < 0.05$). Tale evidenza era associata ad un aumento dei casi di pancitopenia nelle stesse donne con menorragia.

Infine Huang nel 1991 evidenziò in 223 donne esposte a benzene e toluene, confrontandole con 327 donne non esposte, un aumento dei tassi di disordini mestruali (48,9% nelle esposte; 16,2 nelle non esposte), aborti spontanei (5,7% nelle esposte; 2,4% nelle non esposte) e gestosi (22,6% nelle esposte; 10,5% nelle non esposte). Uno studio successivo del 1994 condotto da Strucker et al., non evidenziò

tuttavia un incremento del rischio di aborto spontaneo in mogli di 834 lavoratori esposti a livelli di benzene $\leq 15 \text{ mg/m}^3$.

Nonostante non vi siano evidenze acclamate circa la capacità del benzene di produrre malformazioni, un limitato numero di studi hanno mostrato come tale sostanza sia capace di indurre alterazioni della sfera riproduttiva negli uomini e una ritardata crescita fetale nei test animali (Chatburn et al., 1981; ATSDR, 1997).

Il benzene attraversa la placenta umana ed è presente nel sangue del cordone ombelicale in quantità uguali o superiori alla concentrazione nel sangue materno (Dowty et al., 1976).

Axelsson et al. (1984), in uno studio condotto su 745 donne esposte a solventi organici, evidenziarono un aumento lieve ma non statisticamente significativo dei tassi di aborto spontaneo rispetto alle donne non esposte (tassi di aborti spontanei nelle esposte: 12,2%; tassi di aborti spontanei nelle non esposte: 10,1%) (RR = 1,31, 95% CI = 0.89 - 1.91).

Mukhametova e Vozovaya nel 1972 evidenziarono in donne esposte a benzene ed ad altri idroclorocarburi un'aumentata incidenza di aborti spontanei e parti prematuri (17,2% vs 4,9% nelle non esposte), rottura tardiva di membrana ed asfissia intrauterina del feto.

Nel 1977 Funes-Craviolo et al., mostrarono in 29 lavoratrici esposte al benzene ed ad altri solventi organici nel corso della gravidanza, un'aumentata incidenza di aberrazioni e rotture cromosomiche. I 14 figli di tali donne mostrarono, inoltre, un'aumentata incidenza di rotture cromatidiche, rotture isocromatidiche ($p < 0.01$), e scambi tra cromatidi fratelli ($p < 0.001$) nei linfociti.

Holmberg nel 1979 evidenziò in una lavoratrice esposta al benzene ed ad altri solventi organici (diclorometano, metanolo ed altri) in corso del primo trimestre di gravidanza la nascita di un feto nato morto a causa di anencefalia.

Infine Bordarier et al., nel 1991 esaminando una donna a cui erano state praticate 21 iniezioni intramuscolari di benzene nel tentativo, poi fallito, di indurre l'aborto nel corso del primo trimestre di gravidanza, evidenziarono nel neonato lievi dismorfie

(ipotetorismo), una moderata ipotonia assiale e movimenti oculari anomali. A 45 giorni di vita il bambino mostrava microcefalia, severa ipotonia assiale, severa ipertonia periferica, atrofia ottica bilaterale e la presenza di cavità encefalica che poneva in comunicazione bilateralmente lo spazio subaracnoideo con il ventricolo laterale. Il bambino morì a 2 mesi di vita per polmonite da aspirazione.

I dati derivanti da questi studi sono tuttavia inconcludenti a causa dell'esiguità del campione, dell'assenza di importanti dettagli circa la conduzione dell'esperimento e della presenza di numerose sostanze chimiche oltre al benzene che possono aver influito sul risultato dello studio stesso.

1.3. Benzene e fumo di tabacco

Il fumo di tabacco è una pratica che interessa, secondo stime dell'OMS, 1 miliardo e 100 milioni di persone in tutto il mondo, circa un terzo della popolazione mondiale con più di 15 anni. In Italia si stima vi siano circa 14 milioni di fumatori.

Negli ultimi anni si è assistito ad una riduzione nel consumo di sigarette nei paesi più sviluppati, a fronte di un incremento nelle donne e nei paesi in via di sviluppo (IARC, 2002) (figura 7). Si stima che negli Stati Uniti, a tutto il 2001, vi siano 46.2 milioni di fumatori, con un decremento di circa il 47% rispetto al 1965. Dal 2001 la percentuale di fumatori è diminuita al 24,9% per gli uomini (67% nel 1950) e al 20,6% nelle donne (44% nel 1960).

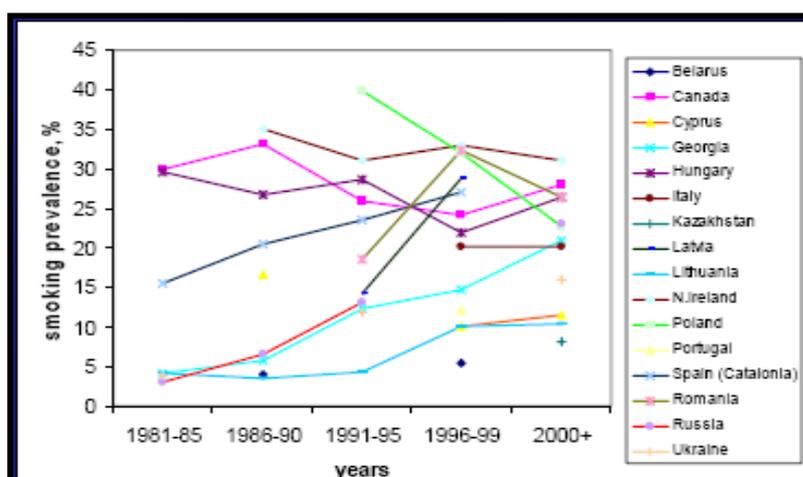


Figura 1.7. Tasso percentuale di prevalenza fumatrici tra i 25 e i 65 anni di età

A ciò si è associato l'aumento di fumatori in sempre più giovane età: il picco di prevalenza è passato dai 25 ai 44 anni, tra il 1965 e il 1990, ai 18 – 24 anni a partire dal 1997. A partire dal 1974 è stato osservato, inoltre, un incremento del 48% del numero di “light smokers” (meno di 15 sigarette al giorno), a fronte di una riduzione del 42% degli “heavy smokers” (più di 24 sigarette al giorno) (ALA 2003).

Da un'indagine [Doxa](#) (figura 8) pubblicata nel [2005](#) risulta che in [Italia](#) il 29,2% della popolazione adulta (di 15 anni ed oltre) dichiara di essere fumatore (il 35% dei maschi e il 23,8% delle donne). Il 29% fuma sigarette e lo 0,2% fuma esclusivamente [pipa](#) o [sigari](#). I fumatori si dividono in due gruppi di pari dimensione secondo il consumo medio quotidiano di sigarette: il 14,1% dichiara di fumare in media meno di 15 sigarette al giorno e il 14,6% di fumare 15 o più sigarette al giorno.

Gli ex fumatori sono il 16,6% del campione (il 25,4% dei maschi e l'8,4% delle femmine) mentre coloro che dichiarano di non essere mai stati fumatori sono il 54,3% del campione (il 39,6% dei maschi e il 67,8% delle femmine).

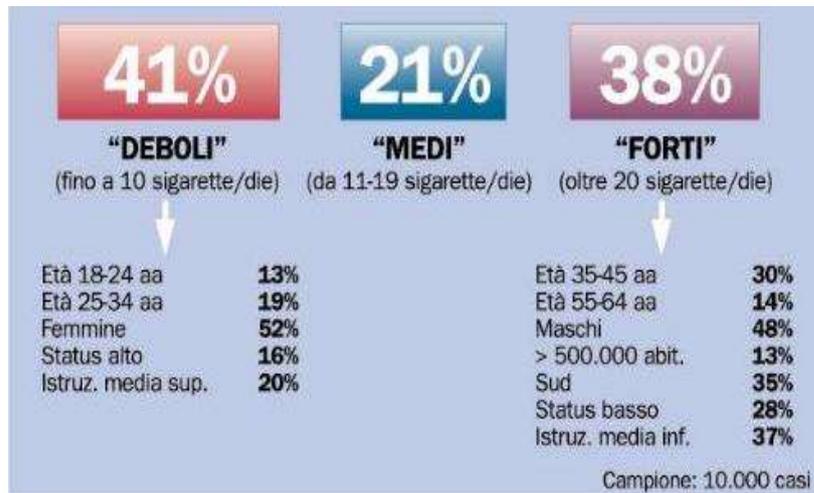


Figura 1.8. Identikit del fumatore italiano

Il fumo di tabacco è un aerosol complesso costituito da una fase vapore e una fase particolata i cui sono distribuiti i vari costituenti del fumo. I costituenti principali del fumo sono: nicotina, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e le nitrosammine tabacco specifiche (NTS) che si ritrovano principalmente nella fase particolata; idrocarburi a basso peso molecolare come il **benzene**, il butadiene e il toluene che sono presenti principalmente nella fase vapore; acido cianidrico e l'ammoniaca che sono stati trovati in entrambe le fasi.

Nel fumo di sigaretta è possibile individuare due componenti: il *mainstream smoke* (parte inalata e filtrata dai polmoni del fumatore) e il *sidestream smoke* (direttamente legata alla combustione del tabacco e della carta). Vi sono differenze nella composizione delle due componenti. Il sidestream smoke è, infatti, generato a temperature più basse rispetto alla componente mainstream smoke (600 °C vs 900 °C); è prodotto in un ambiente deficitario di ossigeno ed è rapidamente diluito. A ciò corrisponde la presenza nel sidestream smoke di particelle di minori dimensioni (0.01 - 0.1 µm) rispetto a quelle presenti nel mainstream smoke (0.1 - 1 µm). Il sidestream smoke contiene, inoltre, maggiori concentrazioni di ammoniaca, ossido nitrico e carcinogeni chimici (benzene, aniline, N-nitrosamine) rispetto al mainstream smoke

(IARC 1986). L'80% del mainstream smoke si deposita nella regione tracheobronchiale, mentre il sidestream smoke raggiunge maggiormente la periferia polmonare.

L'OMS stima che ogni anno il fumo provochi 3 milioni e mezzo di morti e che sia responsabile di 3 decessi su 100, pari a 9.500 morti al giorno. In Italia (figura 9), del mezzo milione di decessi all'anno, quelli attribuibili direttamente al tabacco sono tra gli 80 e i 90 mila. Oltre a essere la causa principale del cancro al polmone (la prima causa di morte per tumore al mondo), il fumo è causa di morte per il 33% di tutti i casi di tumore, per il 30% delle malattie cardiovascolari e per il 75% di tutte le malattie respiratorie. Il 50% dei fumatori muore a causa dei danni procurati dal fumo, 1/4 nella fascia d'età compresa tra i 35 e 65 anni e un altro quarto del totale in età più avanzata.

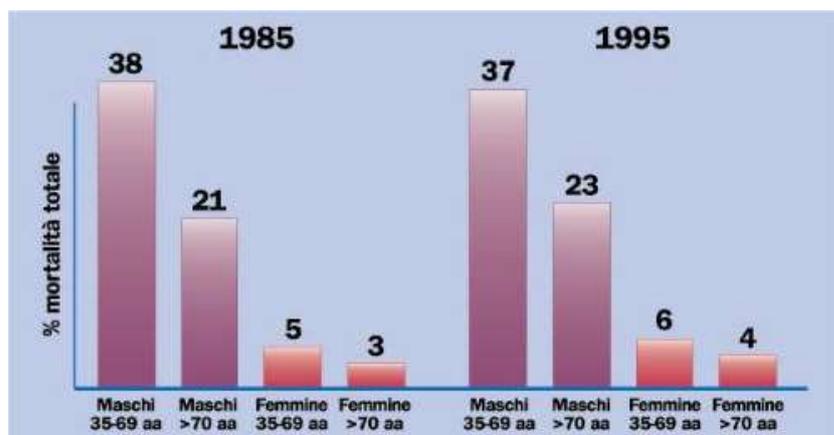


Figura 1.9. Mortalità in Italia correlata al fumo di sigaretta

Nel 1986 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) dichiara che l'uso di tabacco in tutte le sue forme è incompatibile con il raggiungimento dell'obiettivo salute per tutti entro il 2000 (tabagismo al di sotto del 20%); che la nicotina crea dipendenza; che "la sigaretta è uno strumento di morte verso cui la neutralità non è possibile". Nel fumo attivo e in quello passivo sono state infatti individuate numerose sostanze tossiche e cancerogene, potenzialmente pericolose sia per i fumatori che per i non fumatori. Nel mainstream smoke sono state individuate circa 4000 sostanze chimiche. Una metanalisi condotta da Smith et al., nel 1997, rivela come nove delle

44 sostanze classificate dall'IARC come "cancerogeni umani di Gruppo 1" siano presenti nel mainstream sigarette smoke. Tale lista comprende **benzene**, cadmio, arsenico, nickel, chromium, 2-naphthyl-amine, vinyl chloride, 4-aminobiphenyl e berillio. La dose di ciascuna sostanza individuata nel fumo di sigaretta varia a seconda del tipo di analisi e del tipo di sigaretta stessa (tabella 5).

Tabella 1.5. Concentrazione (media \pm ds) dei principali costituenti nelle marche di sigarette. (Marchei et al., *Composizione Chimica Del Fumo Principale Di Sigaretta - Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento del Farmaco*).

Marca	Totale IPA (ng/cig)	Totale NTS (ng/cig)	Totale Ammine aromatiche (ng/cig)	Cadmio (ng/cig)	Benzene (ng/cig)
MS	1272 \pm 120	219.7 \pm 36.6	18.7 \pm 3.40	36.8 \pm 0.6	36.8 \pm 1.5
Marlboro Red	943 \pm 126	239.5 \pm 39.8	22.1 \pm 4.20	39.3 \pm 1.3	38.9 \pm 0.4
Diana Rossa	1102 \pm 160	156.1 \pm 21.7	20.3 \pm 3.92	38.3 \pm 0.4	36.3 \pm 1.0
Marlboro Silver	638 \pm 72	148.9 \pm 21.1	15.2 \pm 2.68	29.6 \pm 1.3	28.9 \pm 1.8
Camel	645 \pm 73	129.6 \pm 20.2	13.0 \pm 2.31	31.7 \pm 0.9	30.0 \pm 0.2
Diana Blu	840 \pm 108	139.2 \pm 20.6	18.0 \pm 3.22	29.5 \pm 1.0	31.6 \pm 0.4
Merit	498 \pm 55	158.2 \pm 24.0	15.1 \pm 2.68	33.7 \pm 0.9	28.1 \pm 2.6
MSL	580 \pm 83	99.1 \pm 17.1	12.3 \pm 2.17	20.9 \pm 1.3	28.7 \pm 1.3
Philip Morris	382 \pm 39	113.3 \pm 16.6	11.0 \pm 1.91	15.9 \pm 1.3	16.1 \pm 0.7
Philip Morris One	179 \pm 19	37.8 \pm 6.7	6.3 \pm 1.16	3.29 \pm 0.71	7.3 \pm 0.6

La concentrazione di tali sostanze nel fumo di sigaretta può comunque essere modificata da vari fattori tra cui si annoverano per importanza il tipo di tabacco coltivato; l'utilizzo di fertilizzanti o additivi; le caratteristiche del clima e del terreno di coltivazione del tabacco; il pH; il tipo di carta e di filtro utilizzato; il livello di ventilazione. In particolare la concentrazione di benzene individuata nel fumo di sigaretta è correlata con la quantità di tabacco combusto.

Per quel che riguarda il fumo attivo, pubblicò nel 1986 una corposa lista di organi bersaglio del fumo come agente cancerogeno, tra i quali il polmone, il cavo orale, la faringe, la laringe, l'esofago, il pancreas, la vescica ed i reni. Dal 1986 sono stati individuati altri tumori associati al fumo attivo come quelli allo stomaco, fegato,

cavità nasali, cervice uterina ecc., fino alla classificazione da parte della IARC nel 2002 ad agente cancerogeno per l'uomo (gruppo 1). Nei fumatori il rischio di cancro aumenta, rispetto ai non fumatori, di circa 3 volte per il cancro del pancreas, di circa 20 volte per il carcinoma polmonare. Nei soggetti fumatori con cancro polmonare è stata, inoltre, individuata una più alta incidenza di mutazioni di *TP53* e di *KRAS*, rispetto ai non fumatori.

Per quel che riguarda invece il [fumo passivo](#) nel 1986 l'IARC in base ad una serie di dati epidemiologici, lo identificò come possibile agente cancerogeno per il polmone. Successivamente nel 1992, l'*U.S. Environmental Protection Agency* (EPA), analizzando gli studi pubblicati fino a quel momento, classificò il fumo passivo come cancerogeno di classe A, cioè un cancerogeno umano noto. Nel 2002 la IARC inserì il fumo passivo nella lista degli agenti cancerogeni del gruppo 1.

L'azione cancerogena prodotta dal fumo di sigaretta è da attribuire a tre processi fondamentali:

3. formazione di addotti del DNA, presenti in elevate concentrazioni nel tratto respiratorio, nella vescica, nella cervice, nel sangue periferico, nella placenta ed in altri tessuti dei fumatori rispetto ai non fumatori;
4. formazione di legami covalenti tra i carcinogeni presenti nel fumo e le proteine del sangue. In particolare assumono un ruolo fondamentale sostanze come le amine aromatiche (4-aminobifenil), gli idrocarburi aromatici policiclici (benzo[a]pirene), le nitrosamine tabacco-specifiche (4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone), il benzene e l'acrilamide;
5. induzione o inibizione di enzimi fondamentali per il metabolismo di sostanze xenobiotiche e di carcinogeni chimici (IARC, 2002).

Il fumo di sigaretta è inoltre associato a:

- a. aumentata incidenza di BPCO – Broncopneumopatia cronica ostruttiva;
- b. aumento della pressione arteriosa di circa 30 mmHg;

- c. aumentata incidenza di aterosclerosi, angina pectoris, infarto e arresto cardiaco (l'età media del primo infarto tra le persone non dedite al fumo è di 63 anni, nei fumatori di oltre 25 sigarette al giorno è di 53 anni, in quelli accaniti che fumano 2 pacchetti al giorno l'età si abbassa a 51 anni. Il rischio aumenta anche in rapporto all'età d'inizio al fumo);
- d. aumentata incidenza di ipertensione ed insufficienza renale;
- e. aumentata incidenza di disturbi dell'udito, vertigini, ictus ed emiparalisi;
- f. aumentata incidenza di ulcere gastriche e intestinali;
- g. aumentata incidenza di dolori alla schiena: i dischi intervertebrali non ricevono una quantità di sangue e di nutrimento sufficienti, degenerano e diventano lentamente più sottili;
- h. aumentata incidenza di gengivite;
- i. presenza di "*gambe del fumatore*": questa patologia consiste nel restringimento e nell'occlusione di arterie delle gambe, con conseguente manifestazione dolorosa durante la deambulazione. Il restringimento a carico dei vasi può assumere proporzioni molto gravi tanto da portare, nei casi estremi, all'amputazione dell'arto interessato. La quota annua di amputazione viene stimata a più di 300.000 casi;
- j. aumentata incidenza di impotenza (la coppia che fuma ha il 40% in meno di possibilità riproduttive);
- k. diminuzione dei livelli di progesterone rendendo difficile l'annidamento dell'uovo fecondato nella mucosa uterina ed alterandone la maturazione;
- l. alterazione contrattilità delle tube, ostacolando il trasporto degli ovociti e l'incontro con gli spermatozoi;
- m. aumento rischio, anche sulle ex fumatrici, di gravidanze extrauterine stimato tra il 30 ed il 200%;
- n. alterazioni del ciclo ovulatorio;
- o. aumentata incidenza di complicanze in gravidanza: aborto spontaneo, parto prematuro, basso peso alla nascita e mortalità perinatale;

- p. menopausa precoce;
- q. riduzione della densità ossea in menopausa.

I Linea di Ricerca:

Analisi dei livelli di benzene nelle donne sottoposte a tecniche di PMA

BASI DI PARTENZA SCIENTIFICA

Numerose evidenze mostrano come il benzene, idrocarburo aromatico noto per le sue proprietà di cancerogeno chimico, sia associato, tanto negli animali quanto nell'uomo, ad una serie di condizioni cliniche che sembrano incidere sul processo riproduttivo. In particolare, l'esposizione al benzene in ambiente lavorativo è stato associato ad aumentata incidenza di menorragia, oligomenorrea, sterilità, ipoplasia e degenerazione ovarica (Vara e Kinnunen, 1946); a maggiori tassi di interruzione prematura di gravidanza, rottura di placenta e asfissia intrauterina del feto (Mukhametova e Vozovaya, 1972); ad un aumento dei tassi di disordini mestruali, aborti spontanei e gestosi (Huang, 1991).

Appare altresì chiaro come il fumo di sigaretta rappresenti la maggiore sorgente di esposizione al benzene: un fumatore medio assorbe circa 1,8 mg di benzene al giorno, valore circa 10 volte superiore rispetto a quello assorbito mediamente da un non fumatore.

Nonostante ciò, mancano ancora studi che abbiano messo in evidenza il nesso causale tra la presenza di benzene e il deficit riproduttivo. In tal senso la PMA offre l'opportunità di valutare le concentrazioni di variabili biochimiche e/o ambientali all'interno del microambiente follicolare e di rapportarle a parametri di esito quale la qualità degli ovociti e degli embrioni. Tale procedura, pertanto, rappresenta di conseguenza un modello "in vivo" ottimale per valutare, in modo diretto, gli effetti del benzene sulle singole tappe del processo riproduttivo.

Obiettivo dello studio

Scopo dello studio è quello di valutare la relazione tra i livelli di benzene nei liquidi follicolari e l'outcome dei cicli di PMA. In particolare le concentrazioni di benzene saranno correlate alla qualità ovocitaria, ai tassi di fertilizzazione, alla qualità dell'embrione ed ai tassi di gravidanza. Sarà inoltre valutato l'impatto di variabili ambientali, con particolare riferimento ai dati demografici e alle abitudini comportamentali, sui livelli di concentrazione di benzene intrafollicolare.

RISULTATI I LINEA DI RICERCA

Association between intrafollicular concentration of benzene and outcome of controller ovarian stimulation in IVF/ICSI cycles: a pilot study.

Journal of Ovarian Reserch. 2014

Alviggi C., Guadagni R., Conforti A., Coppola G., Picarelli S., De Rosa P., Vallone R., Strina I., Pagano T., Mollo A., Acampora A., De Placido G.

2. Ruolo delle variabili genetiche: gonadotropine e loro recettori.

Basi biologico-molecolari della follicologenesi

Circa il 10% della popolazione cellulare dell'ipofisi anteriore è costituito dalle cellule gonadotrope. Esse producono due gonadotropine, l'ormone luteinizzante [*luteinising hormone* (LH)] e l'ormone follicolo stimolante [*follicle stimulating hormone* (FSH)]. Analogamente all'ormone tiroideo stimolante [*thyroid stimulating hormone* (TSH)] ed alla gonadotropina corionica [*human chorionic gonadotropin* (hCG)], l'LH e l'FSH sono ormoni glicoproteici costituiti da due subunità: α e β . La subunità α è comune a tutti questi ormoni glicoproteici, mentre la specificità viene conferita dalla subunità β , codificata da geni diversi. La sintesi ed il rilascio delle gonadotropine sono fenomeni regolati in maniera dinamica, e questo si può notare in particolare nella donna in cui i livelli degli steroidi gonadici variano, nell'ambito del singolo ciclo mestruale, in maniera rapidamente fluttuante. Il fattore di rilascio delle gonadotropine [*gonadotropin releasing hormone* (GnRH)] ipotalamico, un peptide di 10 aminoacidi sintetizzato nella regione preottica, regola la sintesi e la secrezione di entrambe le gonadotropine. Il GnRH viene secreto, in maniera pulsatile, ogni 60-120 minuti e tali impulsi, a loro volta, determinano quelli di LH ed FSH. Il GnRH agisce tramite un recettore accoppiato alle proteine G che, una volta scisse, attivano la via della fosfolipasi C, della proteinchinasi C e del calcio intracellulare. La secrezione di tipo pulsatile è di fondamentale importanza per l'azione del GnRH; essa infatti determina il *priming* delle cellule gonadotrope, mentre la produzione continua dell'ormone ne provoca la desensibilizzazione. Prendendo come spunto tale fenomeno, gli analoghi del GnRH (GnRH-a) vengono utilizzati, in somministrazione continua, per sopprimere la pulsatilità delle gonadotropine nei bambini con pubertà precoce, negli uomini con carcinoma della prostata, nelle donne con endometriosi genitale ed extragenitale (stadi I-IV), nel trattamento della fibromiomas uterina. Essi sono usati, inoltre, in alcuni protocolli di induzione dell'ovulazione al fine di ridurre la produzione endogena di gonadotropine, e permettere un controllo ormonale esterno.

Gli estrogeni, poi, agiscono a livello ipotalamico ed ipofisario per regolare la secrezione delle gonadotropine. Infatti, l'esposizione cronica agli estrogeni ha un effetto inibitorio sia sulla funzione ipotalamica che ipofisaria, mentre livelli crescenti di estrogeni, come si osservano al momento del picco pre-ovulatorio, esercitano un *feedback* positivo aumentando l'ampiezza e la frequenza di immissione in circolo delle gonadotropine. Il progesterone, al contrario, riduce la frequenza delle pulsazioni ma esalta la risposta dei nuclei gonadotropine-secerenti al GnRH.

Nonostante il GnRH sia il fattore principale nella regolazione della secrezione di LH ed FSH, la sintesi di quest'ultimo è anche sotto il controllo dei peptidi gonadici *activina* ed *inibina*, che fanno parte della famiglia dei fattori di crescita trasformanti β (TGF- β). L'*inibina* agisce contrastando selettivamente la secrezione di FSH, mentre l'*activina* ne stimola la sintesi.

Secondo il modello classico modello definito "*teoria delle duecellule*", l'attività delle due gonadotropine a livello dell'unità follicolo-ovocitaria si estrinseca, nei differenti compartimenti, in maniera differenziata [Filicori, 1999; Lèvy *et al.*, 2000 (Fig. 1)].

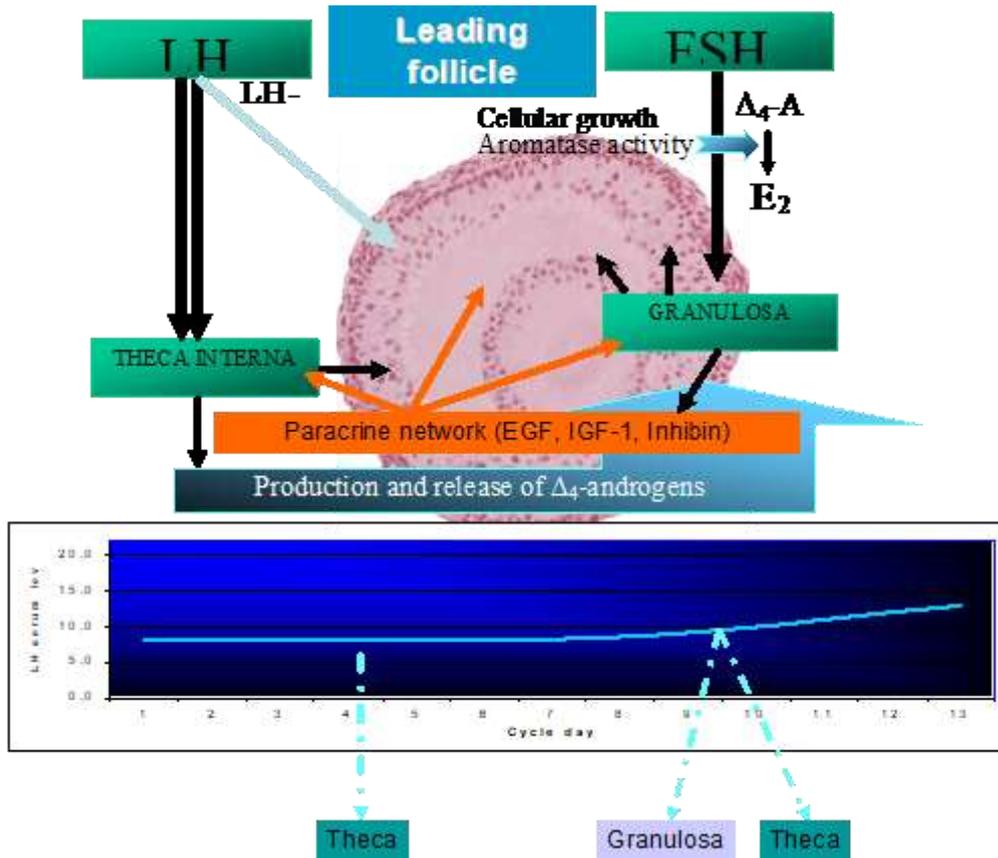


Fig. 2.1. “Teoria delle due cellule”. Rappresentazione schematica dell’attività biologica dell’LH e dell’FSH a carico, rispettivamente, della teca e della granulosa. L’LH agisce sulla teca in fase follicolare precoce, inducendo la produzione di androgeni. Dalla fase follicolare intermedia, l’LH media effetti anche a livello della granulosa. In particolare, l’ormone coadiuva l’FSH nella induzione dell’aromatasi e delle attività paracrine (fattori di crescita e citochine) indispensabili alla maturazione del follicolo dominante.

Secondo questa teoria, si possono distinguere a livello ovarico due compartimenti, la granulosa e la teca interna, *targets* rispettivamente dell’attività biologica dell’FSH e dell’LH. Il legame dell’FSH ai propri recettori, rappresentati particolarmente dalle cellule della granulosa durante la fase follicolare del ciclo, produce tre effetti fondamentali: la proliferazione cellulare, l’induzione dell’aromatasi, enzima responsabile della conversione del substrato androgenico in 17β estradiolo (E_2) ed, infine, l’induzione dell’espressione dei recettori per l’LH. Si realizza, così, una sorta di *priming* sul compartimento della granulosa che, nel corso della fase follicolare medio-avanzata, risulterà adeguatamente recettivo all’azione diretta dell’LH.

Quest'ultimo estrinseca, nel corso di tutta la fase follicolare, la propria attività biologica sulle cellule dello stroma e della teca interna, inducendo la biosintesi degli androgeni (in prevalenza Δ_4 -Androstenedione e Testosterone) a partire dal colesterolo circolante. Questi, diffondendosi nel compartimento delle cellule della granulosa, vengono convertiti in E_2 dall'aromatasi. La produzione di estrogeni ovarici rappresenta, quindi, il risultato dell'azione sinergica di FSH ed LH nei due compartimenti follicolari, teca e granulosa.

Come precedentemente evidenziato, l'LH inizia a giocare un ruolo chiave nella regolazione della crescita follicolare a partire dalla fase follicolare intermedia. A tale stadio, i recettori dell'ormone sono espressi da entrambi i compartimenti. E' pertanto verosimile che, oltre al ruolo di sostegno nella steroidogenesi estrinsecata a livello della teca interna, l'LH cooperi con l'FSH nell'induzione e regolazione delle attività della granulosa. A supporto di questa ipotesi risultano i dati che dimostrano come, da un certo momento della crescita follicolare, l'LH sia in grado, anche in assenza di FSH, di sostenere l'intero processo di selezione del follicolo dominante, sino all'attivazione dei meccanismi che conducono allo scoppio del follicolo e, quindi, all'evento ovulatorio (Schoot *et al.*, 1992). L'LH, infine, in seguito al picco indotto dall'aumento dei livelli di estrogeni proprio delle fasi terminali della crescita follicolare, determina i fenomeni propri dell'ovulazione, ossia la deiscenza follicolare, la luteinizzazione della granulosa e lo sblocco della meiosi I a livello ovocitario.

Polimorfismi o mutazioni del recettore dell'FSH

L'FSH è il principale ormone della riproduzione necessario per lo sviluppo e la maturazione delle gonadi nella pubertà e per la produzione di gameti durante le fasi fertili della vita. L'FSH lega un suo recettore (FSHR) specifico localizzato esclusivamente nelle gonadi. Il L'FSHR mappa sul braccio corto del cromosoma 2 (2p21) e appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G, costituite da sette domini transmembrana. Tali domini ad α elica, essendo idrofobici ed

attraversando il doppio strato lipidico cellulare, sono in grado di formare una tasca in cui va a posizionarsi il ligando; il dominio extracellulare, di dimensione variabile, è la sede di legame dell'ormone. Tale interazione porta alla modificazione conformazionale dei domini transmembrana a cui segue la cascata degli eventi intracellulari che porta alla trasmissione del segnale; una serie di complessi proteici intracellulari svolge questa funzione grazie al legame con le proteine G stesse. Tali proteine, in grado di legare nucleotidi guanidici (GTP e GDP), sono complessi eterodimerici formati da tre subunità α , β e γ . La prima subunità contiene il sito di legame per il nucleotide guanidico e idrolizza il GTP in GDP; le subunità β e γ , tra loro strettamente legate, modulano l'attività della subunità α e interagiscono con le vie di trasduzione del segnale intracellulare. Il legame dell'ormone con il recettore consente il legame della subunità α al GTP, che può così dissociarsi dal complesso $\beta\gamma$ ed, attivandosi, interagire con l'adenilato ciclasi; quest'ultima, a propria volta, provoca un'aumentata concentrazione di cAMP che si riflette nella trasduzione del segnale a livello intracellulare. La idrolisi del GTP in GDP inattiva la sequenza e rende il recettore disponibile ad un nuovo legame (fig.2).

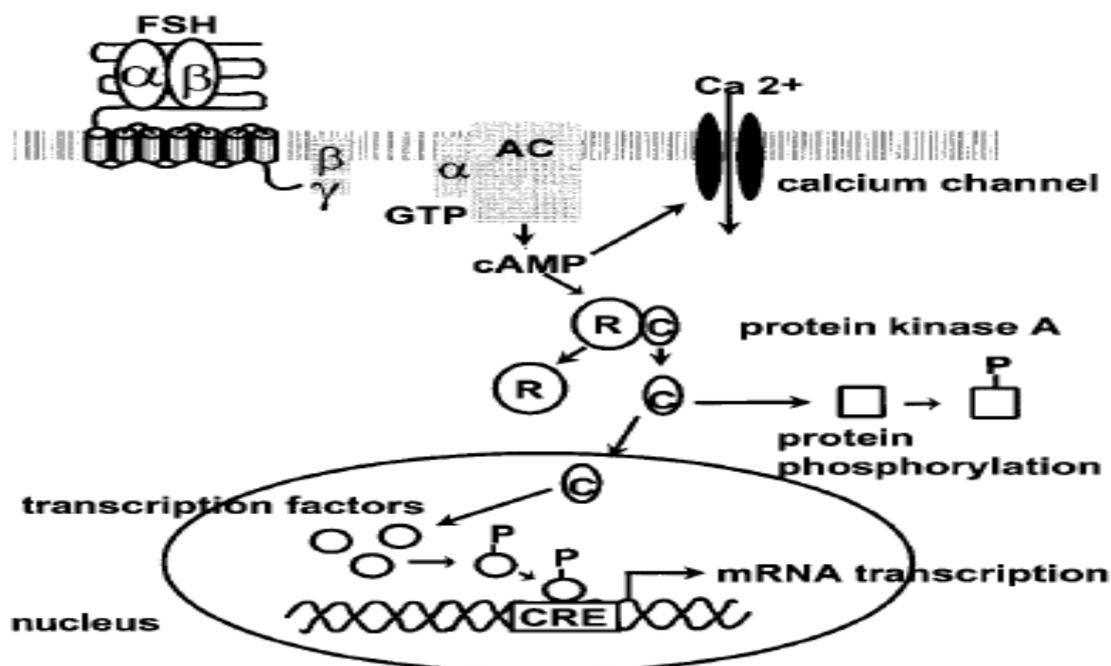


Fig. 2.2. Modello della trasduzione del segnale dell'FSHR: in seguito al legame dell'FSH al proprio recettore, si assiste alla dissociazione della subunità α della proteina G. Tale subunità lega GTP formando un complesso che a sua volta attiva l'adenilato ciclasi con formazione di cAMP. Quest'ultimo attiva la PKA con dissociazione della subunità catalitica (C) dalla subunità regolatoria (R). La subunità catalitica a livello del nucleo fosforifica fattori di trascrizione.

Per polimorfismo si intende una considerevole variabilità genetica, che si riflette in uno o più livelli fenotipici all'interno delle popolazioni, tra le popolazioni o in entrambi i casi. Più precisamente, se tale variabilità è inferiore all'1%, si parla di *mutazione*, se invece è maggiore, allora si può parlare di *polimorfismo*.

In letteratura sono descritte mutazioni o delezioni dell'FSHR in grado di alterare il legame dell'FSH e/o i meccanismi di trasduzione del segnale. Per quanto concerne le varianti alleliche, esistono due polimorfismi a singolo nucleotide localizzati a livello dell'esone 10 del gene FSHR:

- il polimorfismo **Asn680Ser**, determinato da una variazione nucleotidica A→G in posizione 2039, che produce una variazione aminoacidica da Asn a Ser in posizione 680;
- il polimorfismo **Thr307Ala**, determinato da una variazione nucleotidica A→G in posizione 919, che produce una variazione aminoacidica da Thr ad Ala in posizione 307.

I suddetti polimorfismi sono tra di loro in *linkagedisequilibrium*, cioè a Ser680 è associata anche 307Ala, rendendo molto frequenti due combinazioni alleliche delle quattro possibili: Thr307-Asn680 e Ala307-Ser680. La frequenza della distribuzione delle suddette isoforme del FSHR è tale che, nella popolazione generale, l'omozigosi Asn/Asn si riscontra nel 45% dei casi, laddove lo stato di eterozigosi (Asn/Ser) è presente nel 29%. Nel rimanente 26% si osserva omozigosi Ser/Ser. (Perez-Mayorga *et al.*, JCEM 2000).

Diversi studi hanno indagato l'attività biologica "*in vivo*" della variante Ser680. Uno studio osservazionale eseguito in donne normogonadotrope ed eumenorroiche ha evidenziato come portatrici del genotipo Ser/Ser presentassero valori basali di FSH significativamente più alti rispetto ai soggetti con genotipi Asn/Ser e Asn/Asn. In aggiunta, in tale sottogruppo veniva riscontrato un incremento statisticamente significativo della lunghezza media del ciclo mestruale, dell'intervallo intercorrente tra la luteolisi e l'ovulazione e del numero medio di follicoli antrali in fase follicolare precoce (Greb *et al.*, JCEM 2005). Nell'insieme, tali riscontri suggeriscono che la variante Ser/Ser sia meno sensibile all'azione dell'FSH. L'ipotesi è che si tratti di fenomeni compensatori, atti a garantire una crescita follicolare adeguata in condizioni di maggiore resistenza ovarica all'ormone endogeno.

II LINEA DI RICERCA:

Associazione tra polimorfismi delle gonadotropine e dei loro recettori e risposta ovarica alle gonadotropine esogene in pazienti sottoposte a cicli di procreazione medicalmente assistita

Background

L'approccio farmacogenomico alla stimolazione ovarica ha suscitato un interesse crescent nell'ambito della medicina della riproduzione (Altmäe et al., 2011). Ad oggi, la stimolazione ovarica controllata (COS) si imposta in base alla storia clinica, alle caratteristiche demografiche e antropometriche e ai markers di riserva ovarica come la conta dei follicoli antrali e l'ormone anti-mulleriano. L'idea che il profilo genetico individuale potrebbe influenzare la COS è suggerita da diverse evidenze. Nel dettaglio, molti ricercatori hanno approfondito i possibili effetti di specifici polimorfismi di geni delle gonadotropine e dei recettori delle gonadotropine.

Il polimorfismo del recettore dell'FSH (FSH-R) localizzato a livello dell'esone 10 in posizione 680 (FSH-R N680S; rs6166) è stato quello più ampiamente investigato. Nello specifico, le donne omozigoti per FSHR S680 necessitavano di dosi più elevate di gonadotropine esogene durante la stimolazione (Behre et al., 2005, Sudo et al., 2002) e mostravano livelli di FSH basali più elevate (Yan et al., 2013, Perez Mayorga et al., 2000). Inoltre, alcuni autori hanno riportato un rischio incrementato di sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS) nelle donne omozigoti FSHR S680 (Daelemans et al., 2004).

Anche il polimorfismo nella regione 5' non tradotta dell'FSHR (FSH-R-29G>A, rs1394205) sembra condizionare la risposta ovarica alle gonadotropine esogene. Nel dettaglio, le omozigoti AA presentano un numero ridotto di ovociti recuperati e un tasso di gravidanza evolutiva minore se confrontate con altri genotipi (Achrekar et al., 2009a).

Un altro studio sembra supportare queste evidenze, dal momento che riporta anch'esso un numero ridotto di ovociti in fase MII nelle donne con un genotipo AA rispetto a quelle con un genotipo GG (Desai et al., 2011). Ciò nonostante, Tohlob et al. Hanno riportato un tasso di nati vivi più alto nelle donne portatrici dell'allele A in un'analisi retrospettiva di 603 pazienti sottoposte a tecniche di fecondazione in vitro. (Tohlob et al., 2016).

Finora, è stato documentato anche l'impiego di un dosaggio più elevato di FSH esogeno nelle portatrici di una variante genica della sub unità beta del recettore dell'LH (rs1800447) (Alviggi et al., 2011b, Alviggi et al., 2013). Questo polimorfismo è caratterizzato da una ridotta emivita in vivo comparata con le forme wild type (Haavisto et al., 1995) ed è ampiamente espresso nella popolazione del Nord Europa.

Anche un polimorfismo a livello del recettore dell'LH e della gonadotropina corionica(LHCG-R) è stato recentemente investigato. Nel dettaglio, in un grande studio trasversale che ha incluso 384 pazienti sottoposte a IVF è stato osservato un tasso più elevato di gravidanza nelle donne portatrici del polimorfismo LHCG-R S312 rispetto a quelle portatrici dell'N312 (LHCG-R N312S, rs2293275). Inoltre, queste pazienti hanno necessitato di dosi più elevate di FSH esogeno rispetto a quelle omozigoti N. Questo polimorfismo è anche associato con la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) con un rischio aumentato di 2.7 volte nelle omozigoti NN nella popolazione sarda (Alviggi et al., 2013).

Questi polimorfismi menzionati sembrano anche esercitare un effetto sulla stimolazione ovarica quando combinate. Per esempio, le donne omozigoti per S sia nel polimorfismo FSH-R N680S che in quello LHCG-R N312S hanno mostrato un tasso di gravidanza più elevato se confrontate con quelle omozigoti per N (Lindgren et al., 2016). Inoltre, uno studio retrospettivo ha dimostrato che le omozigoti sia AA dell' FSH-R -29 e Asn/Asn FSH-R N680S hanno un incrementato rischio di risposta ovarica inappropriata alla stimolazione farmacologica (Desai et al., 2013). La presenza di FSH B 211 GT e FSHR2039 AA si è rilevata essere associata una

riduzione significativa dei livelli di FSH in terza giornata rispetto al genotipo FSHB-211 GG/FSHR2039 GG.

Ciò nonostante, la maggior parte degli studi su questo tema è basata su analisi retrospettive con rilevanti bias di selezione tra i diversi trials. Inoltre, l'eterogeneità in termini di protocolli di IVF adottati e pazienti reclutate rende questi risultati ancora discutibili. Infine, l'effetto combinato dei diversi polimorfismi è stato principalmente studiato in modo retrospettivo coinvolgendo solo un numero limitato di polimorfismi. Lo scopo della presente analisi prospettica è di valutare l'influenza di polimorfismi multipli della gonadotropina e del suo recettore in donne sottoposte a COS per ART co-trattate con un protocollo lungo di down-regolazione con GnRH α e dose iniziale fissa di FSH.

Materiali and metodi

Popolazione di studio

Sono state incluse solo le donne caucasiche che rispettavano i seguenti criteri di inclusione: Età tra 20-35 anni; Indice di massa corporea (BMI) tra 20-27 Kg / m²; FSH basale ≤ 10 IU / l; Indicazione per il trattamento IVF; presenza di entrambe le ovaie funzionali. I criteri di esclusione erano: anomalie della cavità uterina rilevate sia con ultrasuoni che con isteroscopia, disordini infiammatori-immunologici, endocrini o sistemici, diagnosi di sindrome dell'ovaio policistico secondo i criteri di Rotterdam, endometriosi. Inoltre, sono state escluse le donne con una storia di più di due cicli di IVF precedenti con risposta ovarica normale o precedente ciclo di stimolazione che era stato annullato per insufficiente risposta ovarica o in cui erano stati recuperati <4 ovociti. È stata inoltre eseguita una selezione specifica nell'ambito delle pazienti ammesse ad effettuare stimolazione ovarica. Infatti, le pazienti che hanno avuto una dose giornaliera di gonadotropine ridotta al quinto giorno di stimolazione e che hanno richiesto un aumento del dosaggio il giorno 8 sono state escluse dallo studio. Infine, non sono state incluse pazienti che mostravano rischio aumentato di OHSS.

Protocollo di stimolazione

Tutte le pazienti sono state sottoposte ad un protocollo lungo di down regolazione a base di GnRH-a con buserelina acetato (Suprefact) come segue: 0,5 mg s.c. giornalmente dalla fase luteale intermedia per 12-14 giorni, dopo di che la dose è stata ridotta a 0,2 mg. Dopo 14 giorni sono state effettuate delle valutazioni transvaginali-ecografiche (TV-USG) e biochimiche: solo donne con livello di E2 sierico <40 pg / ml, spessore endometriale <5 mm e sviluppo follicolare arrestato sono state ammesse per la stimolazione ovarica controllata. Le donne con soppressione non ottimale (comprese le pazienti che sviluppavano cisti ovariche dopo la somministrazione del GnRH-a) sono state escluse. Una dose fissa giornaliera iniziale di 150 UI di r-hFSH è stata stabilita per tutte le partecipanti (Gonal-F®; Merck Serono S.p.A, Roma, Italia). La dose iniziale di gonadotropina è stata mantenuta per quattro giorni. I livelli sierici di E2 sono stati misurati il quinto giorno di stimolazione. In quel giorno, la dose giornaliera di gonadotropina è stata modificata solo nelle donne con concentrazione $E2 > 180$ pg / ml. Solo in questi casi, secondo la pratica clinica standard, è stata adottata una dose giornaliera di r-hFSH di 112,5 UI. La crescita follicolare è stata valutata dal giorno 8 della stimolazione mediante USG-TV. Solo le pazienti che presentavano almeno 6 follicoli compresi tra 6 e 10 mm, ma nessun follicolo con diametro medio > 10 mm hanno ricevuto un aumento della dose giornaliera di gonadotropina. Nello specifico, la dose di FSH è stata aumentata di 150 UI al giorno di r-hFSH, dando una dose giornaliera cumulativa di 300 UI. Le donne che hanno avuto una dose giornaliera di gonadotropina ridotta al quinto giorno di stimolazione e che hanno richiesto un nuovo aumento il giorno 8 sono state escluse dall'osservazione. I livelli sierici di E2 sono stati misurati nei giorni 1, 5, 8 della stimolazione e nel giorno della somministrazione di gonadotropina corionica umana (hCG).

La dose ovulatoria di 10.000 UI di hCG o 250 mcg di r-hCG è stata somministrata in presenza di tre follicoli con un diametro medio di almeno 17 mm secondo pratica clinica. Gli ovociti sono stati recuperati mediante aspirazione transvaginale

ecoguidata 34-36 ore dopo l'iniezione di hCG. Le concentrazioni sieriche di LH sono state misurate il giorno della valutazione della soppressione ipofisaria e all'ottavo giorno di stimolazione.

Campionamento e analisi dei polimorfismi

Sono stati raccolti campioni di sangue per valutare la presenza di diversi polimorfismi. Il sangue venoso (10 ml) è stato lasciato a coagulare e centrifugato a 400 giri per 10 minuti. Il siero è stato separato, diviso in un massimo di quattro aliquote e congelato. I pellet sono stati divisi in quattro aliquote e conservati a -80°C per essere successivamente valutati.

Le concentrazioni di LH e la presenza di v-LH in tutti i campioni di siero raccolti sono state determinate da due diversi IFMA come precedentemente riportato (Pettersson e Soderholm, 1990, Pettersson et al., 1991). In breve, la concentrazione totale di LH è stata determinata utilizzando LHspec (Wallac Oy, Turku, Finlandia) poiché questo dosaggio riconosce anche v-LH (Pettersson et al., 1992). L'altro test, I3 / A2, riconosce solo la forma wt di LH. Un rapporto delle due analisi (wt-LHI3 / A2 / totale LHLHspec) è stato utilizzato per determinare lo stato LH di questi individui. Precedenti studi hanno dimostrato che gli eterozigoti per v-LH hanno un rapporto LH totale / wt compreso tra 0,2 e 0,9 poiché il saggio I3 / A2 riconosce solo circa la metà dell'LH immunoreattivo totale nel siero eterozigote. Il rapporto è $> 0,9$ per gli omozigoti wt-LH e $< 0,2$ per le varianti omozigoti (Nilsson et al., 1997).

Il test per la genotipizzazione personalizzata TacMan® DNP basato su PCR (Applied Biosystems) è stato utilizzato per genotipizzare gli SNP in FSHbeta (rs10835638), FSHR (rs6165 / 6166) e LHR (rs4539842).

Endpoint primari e secondari

L'endpoint primario è stato il rapporto di FSH / ovociti recuperati. Endpoint secondari: livelli di estradiolo nel giorno dell'hCG; dosaggio cumulativo di r-hFSH, numero di follicoli preovulatori, ovociti maturi recuperati (oociti MII), percentuale di oociti maturi; n. ovociti fecondati; numero di embrioni trasferiti, giorni di stimolazione, tasso di impianto, tasso di gravidanza per ciclo, tasso di gravidanza per trasferimento, tasso di gravidanza clinica per ciclo avviato (presenza di embrione con battito cardiaco), tasso di gravidanza clinica per trasferimento (presenza di embrione con battito cardiaco).

Analisi statistica

Le frequenze genotipiche degli SNP valutate sono state ottenute mediante calcolo diretto, utilizzando SNPStats. Il linkage disequilibrium è stato valutato usando SNPStat. L'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato valutato mediante calcolo diretto. Il test del chi quadro è stato utilizzato per confrontare le frequenze SNP dei pazienti arruolati con la popolazione generale (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Abbiamo creato modelli genetici di ereditarietà, confrontando la frequenza dell'allele con la popolazione generale. Quindi, secondo le frequenze dei genotipi, sono stati generati quattro modelli: codominante, dominante, recessivo e sovradominante. La dominanza nella genetica è una relazione tra alleli di un gene, in cui l'effetto di un allele sul fenotipo maschera il contributo di un secondo allele nello stesso locus. La codominanza si verifica quando i contributi di entrambi gli alleli sono visibili nel fenotipo. Considerando i dati disponibili in letteratura, abbiamo considerato dominante l'allele più frequente nella popolazione generale e abbiamo generato questi quattro modelli a partire da queste osservazioni.

Il test di Kolmogorov-Smirnov è stato utilizzato per la valutazione della distribuzione delle variabili. Le differenze per le variabili continue tra i gruppi sono state valutate eseguendo un'analisi univariata ANOVA, per variabili parametriche, e Kruskal-Wallis o Mann-Whitney per quelli non parametrici. Il test di Dunnett è stato utilizzato

come test post-hoc. La regressione di Rho-Sperman è stata utilizzata per la correlazione. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software "Statistical Package for the Social Sciences" per Macintosh (SPSS Inc versione 20.0 USA, Chicago, IL).

Un valore $p < 0,05$ è stato considerato significativo dal punto di vista statistico.

Risultati

Sono state arruolate novantaquattro donne con un'età media di 30.62 ± 2.98 anni e un BMI medio di 23.17 ± 2.43 kg / m², sottoposte a cicli IVF / ICSI. La distribuzione genotipica degli SNP era coerente con l'equilibrio di Hardy-Weinberg e non sono state osservate differenze nel confrontare le frequenze alleliche nel gruppo di studio con la popolazione generale.

Al basale, i livelli sierici medi di FSH erano $6,75 \pm 2,08$ IU / L. Tutte le pazienti sono state trattate con r-HFSH 150 UI al giorno, secondo il protocollo dello studio e il dosaggio medio cumulativo di r-hFSH utilizzato è stato di $1,665,91 \pm 438,36$ UI per una durata media di circa $11,07 \pm 1,54$ giorni. Solo due cicli (2,4%) sono stati interrotti per OHSS, mentre nessun ciclo è stato interrotto per assenza di risposta al sistema operativo.

Dopo COS, i livelli sierici di E2 hanno raggiunto il valore medio di $1655,74 \pm 1009,11$ pg / mL e le donne sottoposte a IVF nel 26,5% dei casi (22 donne) e ICSI nel 73,5% dei casi (61 donne). Quaranta gravidanze (42,5%) sono state diagnosticate attraverso il dosaggio della β hCG e 32 di queste (32,0%) sono state confermate alla valutazione ecografica. Non sono state riscontrate differenze tra donne gravide e non gravide per ciascun parametro considerato nello studio.

FSHR 307 (rs6165) e FSHR 680 (rs6166)

Il numero di ovociti totali recuperati non era diverso considerando sia FSHR rs6165 ($p = 0,510$) sia FSHR rs6166 ($p = 0,170$).

Il rapporto tra ovociti totali e maturi era significativamente diverso tra tre genotipi ($p = 0,050$), con un rapporto inferiore in A / A omozigotico rispetto a donne omozigotiche G / G ed eterozigoti.

Il rapporto tra ovociti totali e maturi era significativamente inferiore nel G / G rispetto alle pazienti omozigoti (A / A) ed eterozigoti (A / G) ($p = 0,049$).

Nel complesso, non sono state riscontrate differenze in entrambi gli SNP considerando il dosaggio totale di r-hFSH utilizzato, il rapporto tra ovociti fecondati e fertilizzati e anche i parametri di base.

FSHR -29 (rs1394205)

Nessuna differenza significativa rispetto ai risultati del trattamento è stata trovata tra i modelli che generano le frequenze dei genotipi.

LHCGR 291 (rs12470652)

Le donne eterozigoti LHCGR hanno mostrato livelli E2 più elevati al giorno della somministrazione di hCG ($p = 0,005$) rispetto al wt. Allo stesso modo, un numero maggiore di ovociti totali recuperati ($p = 0,035$), MII ($p = 0,002$), fertilizzati ($p = 0,001$), ovociti fecondati ($p = 0,001$) ed embrioni crioconservati ($p = 0,001$) è stato rilevato nelle pazienti eterozigoti rispetto a quelle wt. Non sono state trovate differenze significative tra le altre variabili.

LHCGR intronic (rs4073366), LHCGR 312 (rs2293275), FSHB 2623 (rs6169) e v-LH (rs1800447)

Non sono state rilevate differenze significative per tutti i parametri considerando LHCGR rs4073366, LHCGR rs2293275, FSHB rs10835638 e v-LH rs1800447.

Analisi multivariata

La considerazione generale degli otto SNP valutati nello studio ha mostrato che la co-presenza dell'allele C su entrambi FSHR -29 rs1394205 e LHCGR 291 rs12470652 era correlata a un aumento del rapporto tra la dose cumulativa di r-hFSH e il numero totale di ovociti o ovociti maturi (5,47, IC 95%: 3,13-7,81, $p < 0,001$). Questo effetto degli SNP su questi due geni è stato confermato anche considerando lo SNP FSHR rs6166. In particolare, la presenza dell'allele C su questi tre geni era correlata ad un aumento del rapporto tra la dose cumulativa di FSH e il numero totale di ovociti o ovociti maturi (5.44, CI: 3.18-7.71, $p < 0.001$).

Discussione

Per la prima volta, l'analisi simultanea di otto SNP è stata effettuata in 94 donne sottoposte a FIV. Dall'analisi dei nostri dati, è emerso un impatto significativo di diversi SNP sull'outcome riproduttivo femminile. In particolare, due SNP comuni di FSHR (FSHR rs6165 e rs6166) sembrano influenzare in modo significativo il rapporto FSH / ovociti, mentre i livelli basali di E2 sembrano essere associati a LHCGR 291. Inoltre, l'espressione di LHCGR 291 allele C è associato ad un numero più alto di ovociti recuperati e di conseguenza più embrioni crioconservati.

Inoltre, l'analisi multivariata ha rivelato che l'espressione dell'allele C di FSHR -29 (rs1394205), LHCGR 291 (rs12470652) e FSH rs6166 hanno mostrato una relazione significativa con il dosaggio cumulativo di r-hFSH e il numero totale di ovociti maturi.

La possibile implicazione del polimorfismo LHCGR 291 (rs12470652) sulla riproduzione femminile non è mai stata riportata finora. In contrasto con Ackrekar et al. Il 2009 (Achrekar et al., 2009b), il polimorfismo FSHR -29 da solo non si è dimostrato essere associato a una ridotta risposta. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta all'analisi retrospettiva, ai criteri di inclusione e al protocollo eterogeneo adottato da Achrekar et al. Al contrario, nel nostro studio la popolazione rispettava criteri di inclusione rigorosi ed è stata analizzata prospetticamente con una stimolazione ovarica standardizzata. I risultati riguardanti il polimorfismo di FSH-R

rs 6166 e rs 6165 sono coerenti con quelli riportati in letteratura (De Castro et al., 2003, Yan et al., 2013, Perez Mayorga et al., 2000). La resistenza all'FSH nei portatori GG di FSHR rs 6166 sembra essere correlata a specifiche caratteristiche molecolari (Casarini et al., 2014, Casarini et al., 2015). In opposizione ai nostri studi precedenti (Alviggi et al., 2011b, Alviggi et al., 2013), non abbiamo osservato un'associazione tra risposta ovarica e comune polimorfismo LH beta (rs1800447). Questa incongruità potrebbe essere spiegata dall'assenza di portatori omozigoti della variante in questo studio e dalla dimensione limitata del campione rispetto a quelli (oltre 200 casi) riportati nel 2013 (Alviggi et al., 2013). Inoltre, il diverso disegno di studio potrebbe essere stato cruciale per questa discrepanza.

I punti di forza del nostro studio risiedono in diversi aspetti. In primo luogo, abbiamo condotto un'analisi prospettica multicentrica dei dati utilizzando criteri di inclusione rigorosi. In effetti, abbiamo incluso solo donne con una buona prognosi con una dose fissa iniziale giornaliera senza alcuna risposta anomala durante la stimolazione ovarica. Questa decisione è stata presa considerando che l'uso di un dosaggio più elevato di FSH o di un aggiustamento del dosaggio durante la stimolazione potrebbe in qualche modo mitigare l'effetto del genotipo sulla FIV che rappresenta un bias comune riportato in altri studi (Genro et al., 2012).

Inoltre, abbiamo anche eseguito un'analisi multivariata con lo scopo di stabilire se sia presente un'interazione tra diversi polimorfismi e se questa potrebbe influenzare la risposta ovarica. Finora la maggior parte degli studi pubblicati ha focalizzato l'attenzione sul singolo polimorfismo (De Castro et al., 2003, Achrekar et al., 2009b, Jun et al., 2006, Genro et al., 2012, Lazaros et al., 2012) e quelli più recenti su due (Lindgren et al., 2016, Desai et al., 2013). Inoltre, per la prima volta forniamo dati su polimorfismi inesplorati come LHCGR intronic (rs4073366), FSHB 2623 (rs10835638).

Il limite della nostra analisi è essenzialmente legato al numero relativamente piccolo di pazienti coinvolti, considerando la quantità di polimorfismi analizzati. Inoltre, non siamo stati in grado di seguire le pazienti fino al parto, tuttavia forniamo dati sul tasso

di gravidanza in corso. Come altri studi, il nostro non è riuscito a trovare un'associazione significativa con l'esito della gravidanza. A nostro avviso, le nascite da ART forse non rappresentano il parametro ideale per misurare l'effetto del polimorfismo. Infatti, vari fattori come la qualità degli embrioni, l'età della madre, alcuni dei quali si verificano durante le ultime fasi della gravidanza come la restrizione della crescita intrauterina, trascendono gli effetti "fisiologici" delle gonadotropine e dei loro recettori. In altre parole, abbiamo sostenuto che la risposta ovarica in termini di numero di ovociti e consumo di gonadotropina rappresentano i risultati più appropriati per analizzare gli effetti delle gonadotropine e dei loro polimorfismi del recettore nell'AR. Infine, abbiamo preso in considerazione solo le donne che hanno eseguito un protocollo lungo, quindi non possiamo fornire dati sui regimi a base di antagonisti.

In conclusione, il nostro studio ha confermato che un polimorfismo specifico potrebbe influenzare la risposta ovarica alla stimolazione ovarica. Inoltre, abbiamo dimostrato come una valutazione completa dei polimorfismo multipli potrebbe fornire informazioni utili sulla risposta alla COS. I nostri dati devono essere corroborati da ulteriori indagini, in particolare per altri polimorfismi in cui non sono ancora disponibili dati sufficienti per trarre una conclusione definitiva (come LHCGR intronic [rs4073366], FSHB 2623 [rs10835638]). L'uso di specifici profili genotipici nell'ambito della procreazione medicalmente assistita potrebbe portare a un approccio farmacogenomico personalizzato e innovativo alla stimolazione ovarica.

Figura 2.1 Coespressione di allele C di FSHR -29; LHCGR 291 e dose cumulativa e FSHR rs6166 r-hFSH / numero totale di ovociti o rapporto di ovociti maturi.

	FSHR..29	LHCGR.291	Frequency	Difference (95% CI)	P-value
1	C	T	0.7287	0.00	---
2	T	T	0.2412	0.26 (-0.5 - 1.02)	0.5
3	C	C	0.0243	5.47 (3.13 - 7.82)	<0.0001
rare	*	*	0.0058	1.23 (-4.03 - 6.5)	0.65
Global haplotype association p-value: 0.65					

	FSHR.680	FSHR..29	LHCGR.291	Frequency	Difference (95% CI)	P-value
1	C	C	T	0.3739	0.00	---
2	T	C	T	0.3556	-0.5 (-1.43 - 0.42)	0.29
3	T	T	T	0.1498	0.08 (-0.96 - 1.12)	0.88
4	C	T	T	0.0905	0.07 (-1.16 - 1.3)	0.91
5	C	C	C	0.0235	5.44 (3.18 - 7.71)	<0.0001
rare	*	*	*	0.0066	1.36 (-3.65 - 6.37)	0.6
Global haplotype association p-value: 0.6						

Tabella 2.1:Caratteristiche della popolazione di studio.

Basal characteristics	Values
Age (years)	30.71±2.61
BMI (kg/m ²)	22.94±2.35
AMH (ng/mL)	2.70±1.76
Antral follicle count	12.36±3.63
Basal FSH (IU/L)	6.73±1.98
Basal estradiol (pg/mL)	80.65±101.16

Tabella 2.2: Outcome del trattamento; i dati continui sono espressi come media ± deviazione standard; dati categorici in percentuale.

Treatment outcomes	Values
Total FSH doses (IU)	1725.33±520.15
Days of stimulation	11.24±1.69
Estradiol at the day of hCG (pg/mL)	1655.43±895.59
Follicles >10 mm	11.04±4.41
Follicles >16 mm	7.72±3.15
Oocytes number	9.51±3.82
Mature oocytes number	7.78±3.39
Oocytes inseminated	5.35±3.50
Oocytes fertilized	3.61±2.55
Oocytes cryopreserved	0.35±1.36
Embryos cryopreserved	6.73±1.98
Embryos transferred	1.65±0.80
Cycles cancelled for hyper-response	2 (2.1%)
OHSS	1 (1.1%)
Pregnancy rate (beta-hCG) per cycle	42.5%
Clinical pregnancy rate per cycle	34.0%
Miscarriage rate per cycle	9.4%

Tabella 2.3: Outcome del trattamento, stratificazione dei pazienti in base alla FSHR 307 (rs6165).

	homozygous A/A	heterozygous A/G	homozygous G/G	<i>p</i> - value
Total FSH doses (IU)	1781.23±568.45	1730.04±550.19	1647.17±383.58	0.536
FSH/oocytes	243.42±97.60	338.52±251.80	252.60±166.33	0.050
Days of stimulation	11.13±1.68	11.35±1.82	11.10±1.41	0.769
Endometrial thickness (mm)	9.70±1.15	10.38±2.00	10.28±2.09	0.547
Estradiol at the day of hCG (pg/mL)	1555.24±663.85	1607.54±906.21	1859.42±1092.75	0.513
Follicles ≥ 16mm hCG day hCG	7.63±2.72	7.73±3.26	7.80±3.50	0.983
Oocytes number	9.58±3.32	9.24±3.57	10.10±4.98	0.685
Mature oocytes number	8.13±2.72	7.50±3.71	8.06±3.47	0.643
Oocytes inseminated	6.08±3.26	5.18±3.60	4.90±3.55	0.346
Oocytes fertilized	3.92±2.53	3.60±2.66	3.25±2.38	0.537
Oocytes cryopreserved	0.21±1.02	0.36±1.44	0.50±1.54	0.802
Embryos cryopreserved	0.96±1.81	1.16±2.05	0.65±1.31	0.534
Embryos transferred	1.63±0.77	1.56±0.79	1.90±0.85	0.236
Implantation rate	10/39	23/77	10/38	0.795
Pregnancy rate per embryo transferred	12/39	24/77	11/38	0.867
Ongoing pregnancy rate per embryo transferred	9/39	21/77	9/38	0.792
Pregnancy rate per cycle	12/24	24/50	11/20	0.930
Ongoing pregnancy rate per cycle	9/24	21/50	9/20	0.863

Tabella 2.4: Outcome del trattamento, stratificazione dei pazienti secondo il 680 (rs6166).

	homozygous A/A	heterozygous A/G	homozygous G/G	<i>p</i> - value
Total FSH doses (IU)	1809.76±563.38	1725.25±554.53	1633.02±379.45	0.698
FSH/oocytes	248.80±96.34	333.44±250.88	252.60±166.33	0.049
Days of stimulation	11.42±1.72	11.23±1.81	11.50±1.40	0.804
Endometrial thickness (mm)	9.70±1.15	10.38±2.00	10.28±2.09	0.547
Estradiol at the day of hCG (pg/mL)	1624.09±722.40	1568.46±880.90	1859.42±1092.75	0.514
Follicles ≥ 16mm hCG day hCG	7.58±2.70	7.71±3.28	7.90±3.45	0.944
Oocytes number	9.67±3.33	9.20±3.59	10.05±4.86	0.697
Mature oocytes number	8.22±2.78	7.45±3.67	8.06±3.47	0.725
Oocytes inseminated	6.21±3.35	5.18±3.55	4.76±3.52	0.476
Oocytes fertilized	4.04±2.56	3.57±2.65	3.19±2.38	0.694
Oocytes cryopreserved	0.21±1.02	0.37±1.45	0.48±1.50	0.779
Embryos cryopreserved	1.00±1.82	1.16±2.06	0.62±1.28	0.581
Embryos transferred	1.63±0.77	1.55±0.79	1.90±0.83	0.273
Implantation rate	10/37	21/77	12/40	0.844
Pregnancy rate per embryo transferred	12/37	22/77	13/40	0.839
Ongoing pregnancy rate per embryo transferred	9/37	19/77	11/40	0.848
Pregnancy rate per cycle	12/23	23/50	13/21	0.812
Ongoing pregnancy rate per cycle	9/23	19/50	11/21	0.867

Tabella 2.5: Outcome del trattamento, stratificazione dei pazienti in base al FSHR - 29 (rs1394205).

	homozygous G/G	heterozygous G/A	homozygous A/A	p- value
Total FSH doses (IU)	1730.04±554.55	1745.19±476.55	1601.71±487.46	0.804
FSH/oocytes	322.78±239.49	229.73±109.79	312.83±161.03	0.186
Days of stimulation	11.20±1.52	11.39±1.87	11.50±1.40	0.733
Endometrial thickness (mm)	10.29±2.00	9.91±1.55	10.47±1.36	0.776
Estradiol at the day of hCG (pg/mL)	1518.52±742.11	1832.04±1184.50	2039.14±706.30	0.197
Follicles ≥ 16mm hCG day hCG	8.07±3.23	6.90±2.83	8.50±3.50	0.197
Oocytes number	9.60±3.90	9.58±3.84	8.63±3.54	0.794
Mature oocytes number	7.67±3.65	8.46±2.90	6.50±2.83	0.344
Oocytes inseminated	5.22±3.49	5.90±3.67	4.13±2.70	0.404
Oocytes fertilized	3.47±2.67	3.97±2.60	3.13±1.36	0.595
Oocytes cryopreserved	0.38±1.38	0.19±1.08	0.75±2.12	0.572
Embryos cryopreserved	1.05±2.03	1.03±1.72	0.50±0.76	0.730
Embryos transferred	1.62±0.85	1.61±0.76	2.00±0.53	0.435
Implantation rate	18/88	21/50	4/16	0.934
Pregnancy rate per embryo transferred	22/88	21/50	4/16	0.754
Ongoing pregnancy rate per embryo transferred	16/88	19/50	4/16	0.770
Pregnancy rate per cycle	22/55	21/31	4/8	0.879
Ongoing pregnancy rate per cycle	16/55	19/31	4/8	0.435

Tabella 2.6: Outcome del trattamento, stratificazione dei pazienti secondo LHCGR 291 (rs12470652).

	T/T	C/T	p-value
Total FSH doses (IU)	1736.38±534.53	1568.75±196.17	0.449
FSH/oocytes	305.86±208.66	147.65±46.77	0.069
Days of stimulation	11.21±1.70	11.57±1.62	0.588
Endometrial thickness (mm)	9.97±1.49	11.04±2.76	0.146
Estradiol at the day of hCG (pg/mL)	1580.60±860.03	2733.00±747.23	0.005
Follicles ≥ 16mm hCG day hCG	7.80±3.16	6.71±2.98	0.382
Oocytes number	9.28±3.81	12.43±2.82	0.035
Mature oocytes number	7.45±3.21	11.43±3.41	0.002
Oocytes inseminated	4.92±3.20	10.71±2.56	0.001
Oocytes fertilized	3.24±2.16	8.14±2.91	0.001
Oocytes cryopreserved	0.38±1.41	0.00±0.00	0.480
Embryos cryopreserved	0.75±1.47	4.14±3.08	0.001
Embryos transferred	1.68±0.81	1.29±0.49	0.213
Implantation rate	41/145	2/9	0.992
Pregnancy rate per embryo transferred	45/145	4/9	0.639
Ongoing pregnancy rate per embryo transferred	37/145	2/9	0.861
Pregnancy rate per cycle	45/87	4/7	0.907
Ongoing pregnancy rate per cycle	37/87	2/7	0.747

RISULTATI II LINEA DI RICERCA

In estimated good prognosis patients could unexpected “Hyporesponse” to controlled ovarian stimulation be related to genetic polymorphisms of FSH receptor?

Reproductive Sciences, 2016

Alviggi C., Conforti A., Caprio F., Gizzo S., Noventa M., Strina I., Pagano T., De Rosa P., Carbone F., Colacurci N., De Placido G.

The impact of multiple polymorphisms of gonadotropins and their receptors on controlled ovarian stimulation: a prospective multicenter study.

In fase di submission 2018 (Human Reproduction)

3. Ruolo delle variabili endocrino-metaboliche: Sindrome dell'Ovaio Policistico (PCOs).

3.1 Epidemiologia, fattori di rischio, principali alterazioni endocrine

La PCOs ha una prevalenza che oscilla fra il 6 e il 10% (Knochenhauer *et al.*, 1998), tanto da essere oggi considerata l'alterazione endocrina più comune durante gli anni fertili (Hart *et al.*, 2004). L'endocrinopatia è più frequente, inoltre, nelle giovani donne di razza caucasica.

A dispetto dell'enorme mole di dati laboratoristici, clinici e sperimentali di cui è ricca la letteratura scientifica, l'etiopatogenesi della PCOs rimane oggetto di continue speculazioni.

A sostegno dell'ipotesi di una trasmissione genetica della sindrome è stata evidenziata un'associazione tra PCOs materna ed ovaie policistiche nelle figlie (Battaglia *et al.*, 2002). Inoltre, si ritiene che le ovaie policistiche nell'infanzia possano essere considerate segno di una predisposizione genetica alla PCOs e che fattori ambientali (prevalentemente nutrizionali) possano condizionare la presentazione clinica e biochimica della sindrome nell'adulto (Battaglia *et al.*, 2002). Indipendentemente dall'origine, la sindrome appare caratterizzata da un ampio ventaglio di alterazioni ormonali.

Le analizzeremo singolarmente:

Deficit di FSH. Nelle pazienti con PCOs sono stati osservati livelli più bassi di FSH sierico rispetto a donne con ovulazione fisiologica (Hillier, 1994). Sebbene di rado si osservino livelli sierici francamente ridotti di FSH, è stato dimostrato come, in presenza di PCOs, essi siano soppressi al di sotto del livello di "soglia" necessaria durante la fase follicolare per stimolare la fisiologica maturazione del follicolo (Hillier, 1994). I ridotti livelli della molecola risultano in un accumulo maggiore di follicoli antrali con diametro compreso fra i 2 e gli 8 mm.

I meccanismi alla base della patogenesi di queste anomalie rimangono sconosciuti, ma da ciò che emerge nella letteratura scientifica ci si orienta verso un'ipotesi di *differenze intrinseche* nei meccanismi di follicologenesi fra ovaie di donne normali e di donne affette da tale endocrinopatia (Franks *et al.*, 2000, 2008). A causa di livelli costantemente ridotti di FSH, la follicologenesi è ostacolata ed i follicoli in crescita esitano in raccolte liquide di natura cistica. L'arresto prematuro dei follicoli in crescita interferisce con il processo di selezione del follicolo dominante (Franks *et al.*, 2008), causando *anovulazione*.

Iperincrezione di LH. Solo nel 10-20% delle donne con storia di PCOs i valori di LH e FSH risultano normali (Taylor *et al.*, 1997). Nella restante quota, in fase follicolare precoce si osserva un incremento notevole dei livelli di LH (Balen *et al.*, 1993; Cano *et al.*, 1997) con inversione del rapporto LH/FSH che raggiunge valori approssimabili a circa 2.5.

Il fenomeno dell'iperincrezione di LH è da ricercarsi in differenti cause. In primo luogo, è noto ormai da tempo che indipendentemente dal *primum movens* che determina l'instaurarsi dell'endocrinopatia, nella PCOs si osserva una condizione di franco iperandrogenismo (Yen and Jaffe, 2004); l'aumento degli androgeni circolanti instaura un classico "circolo vizioso" con un persistente *feedback* positivo ipofisario e, quindi, in un mantenimento della iperincrezione di LH. Entrambi i fattori diventano promotori l'uno del manifestarsi dell'altro; in altri termini, l'eccesso di LH favorisce la produzione di androgeni ed un eccesso di androgeni mantiene elevato con *feedback* positivo il tono dell'LH. In presenza di elevate concentrazioni di ormoni steroidi, sembra inoltre inibito l'effetto LH-soppressivo degli estrogeni (Berga *et al.*, 1993) (Eagleson *et al.*, 2000) e la regolazione ipotalamica del GnRH da parte del progesterone (Turgeon *et al.*, 1999).

Altra possibile causa dell'abnorme produzione di LH è un aumento dei *pulses generator* da parte del GnRH a livello ipotalamico. Tale fenomeno, probabilmente promosso non solo dagli stessi androgeni ma anche da alcuni modulatori endogeni, si

traduce in un significativo incremento dell'ampiezza e della frequenza dei *pulses* di LH (Waldstreicher *et al.*, 1988).

Anche l'insulina rappresenta uno stimolo cronico alla produzione di LH. E' infatti dotata di attività steroidogenetica ed è in grado di sinergizzare l'azione dell'LH a livello delle cellule tecali (Balen *et al.* 2005); la sintesi di androgeni risulta così ulteriormente aumentata.

L'incremento di LH durante la follicologenesi si traduce in una soppressione dell'FSH e conseguente alterazione della funzione delle cellule della granulosa. In condizioni fisiologiche, le cellule della granulosa rispondono all'LH solo quando il follicolo ha raggiunto un diametro “soglia” di circa 9-10 mm. Al contrario, in donne affette da PCOs la risposta è anticipata, coinvolgendo anche i piccoli follicoli di circa 4 mm (Willis *et al.*, 1998). Si verificano dunque luteinizzazione precoce ed atresia dei piccoli follicoli antrali. L'effetto conclusivo è la prematura maturazione degli ovociti (Van Der Spuy and Dyer, 2004; Franks *et al.*, 2008) ed anovulazione cronica.

Iperandrogenismo La prevalenza di tale disturbo è approssimativamente pari al 60-80%, e rappresenta l'alterazione endocrina più frequente nell'ambito della stessa sindrome (Azziz *et al.*, 2006). I principali androgeni circolanti sono essenzialmente riconducibili a due distinte fonti: l'ovaio ed il surrene. L'ovaio è la principale sorgente di androstenedione (prodotto per circa il 90% da tale organo) e di testosterone, mentre il surrene produce principalmente *Deidroepiandrosterone-Sulfate* (DHEA-S) oltre che testosterone.

I molteplici effetti esercitati dagli ormoni androgeni sono appannaggio della quota libera, ossia quella non legata chimicamente alla *Sex Hormone Binding Globulin* (SHBG), proteina plasmatica prodotta a livello epatico. Insulti patogenetici in grado di promuovere un incremento nella produzione degli androgeni o in grado di ridurre i livelli di SHBG determinano in ultimo, alla stessa maniera, un incremento della quota di ormone “effettore” contribuendo all'instaurarsi di un *clima iperandrogenico*. Gli androgeni circolanti derivano sia direttamente da un incremento della biosintesi

ovarica [difatti in donne affette da PCOs la fonte di androgeni è quasi esclusivamente ovarica (Buggs *et al.*, 2005)], sia da una riduzione nella sintesi della SHBG, fenomeno spesso presente in pazienti con insulino-resistenza (Balen *et al.*, 1995; Van Der Spuy and Dyer, 2004). Oltre all'insulina, anche gli stessi androgeni appaiono capaci di ridurre attraverso un meccanismo diretto l'espressione della SHBG (Edmunds *et al.*, 1990).

L'aumentata concentrazione di androgeni nel liquido follicolare è associata ad aumentati livelli sierici di LH, i quali possono contribuire ad arrestare lo sviluppo del follicolo dominante portando a blocco e degenerazione (Billig *et al.*, 1993; Kurzawa *et al.*, 2008). E' stato suggerito inoltre che alti livelli di androgeni possano esercitare un effetto negativo sullo sviluppo della competenza ovocitaria (Teissier *et al.*, 2000; Jabara and Coutifaris, 2003). Questo fenomeno è determinante nell'instaurarsi di una condizione di anovulazione cronica.

Il testosterone a livello periferico, inoltre, si rende disponibile per la sua trasformazione a diidrotestosterone, che rappresenta l'ormone biologicamente più efficace. Il processo di conversione è reso possibile dall'attività dell'enzima 5 α -reduttasi, espresso soprattutto a livello cutaneo. Ne deriva un'aumentata crescita di peli anche a livello di regioni normalmente glabre come volto, areole mammarie, linea alba e dorso.

In figura 1 è possibile osservare i principali meccanismi fisiopatogenetici tipici della PCOs. E' evidente dallo schema come si instauri un *circolo vizioso* nel quale ogni singolo fenomeno contribuisca al mantenimento di tutte le altre condizioni. E' tuttavia sconosciuto l'evento chiave che dà l'innescò all'intero processo.

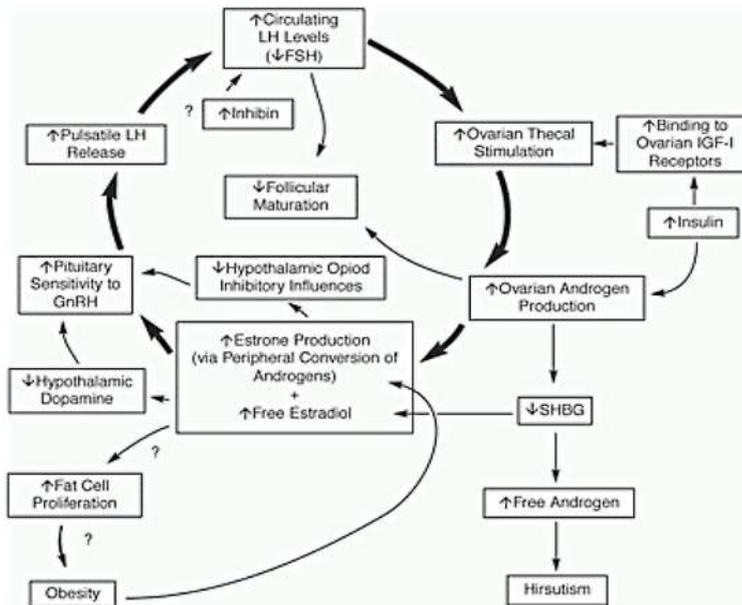


Figura 3.1. Principali meccanismi fisiopatogenetici nella PCOs

3.2 Diagnosi

E' noto come sussistano importanti controversie circa l'identificazione e la definizione di criteri diagnostici condivisi per la PCOs. Questa difficoltà riflette la molteplicità delle manifestazioni fenotipico-cliniche, la loro variabilità in funzione delle diverse fasce d'età, la sovrapposizione di aspetti endocrini ed ultrasonografici con situazioni fisiologiche e, infine, la mancanza di *cut-off* condivisi nella pratica clinica.

La conferenza del National Institute of Health (NIH) nel 1990 raccomandava che i criteri diagnostici per la PCOs includessero:

- oligo-anovulazione
- evidenza biochimica di iperandrogenismo
- esclusione della presenza di altri disordini endocrini che potessero provocare irregolarità mestruali ed iperandrogenismo (Zawadzky *et al.*, 1992)

Tale definizione, pur individuando alcuni dei principali aspetti clinici della sindrome, poco era incline a considerare l'aspetto morfologico della gonade nell'inquadramento

globale. Pertanto, i suddetti criteri furono parzialmente respinti dal gruppo Europeo, senz'altro più incline ad integrare il dato ecografico. Da qui la necessità di una rivisitazione e ridefinizione della PCOs.

Nel 2003 la *Consensus Conference ASRM/ESHRE di Rotterdam* (ESHRE/ASRM, 2004) stabilì che per una diagnosi corretta di PCOs, fosse necessaria, in assenza di altre patologie (ad esempio iperplasia congenita surrenale, tumori androgeno secernenti, sindrome di Cushing) la presenza di almeno 2 su 3 dei seguenti criteri:

-oligo o anovulazione

-segni clinici e/o biochimici di iperandrogenismo

-segni ecografici suggestivi di policistosi ovarica (volume ovarico $\geq 0,10 \text{ cm}^3$ e/o ≥ 12 follicoli di dimensioni comprese fra 2 e 9 mm) in almeno un ovaio.

Nel 2006 l'*Androgen Excess PCOs Society* (Azziz et al., 2006) ha infine proposto che fossero escluse dalla diagnosi di PCOs le pazienti che non presentassero segni clinici o biochimici di iperandrogenismo, esaltando ancora una volta il ruolo fondamentale dell'*iperandrogenismo*.

Tali criteri diagnostici a tutt'oggi sono oggetto di non poche critiche; la sindrome, dunque, risulta oggetto ancora di numerose rivisitazioni, fermo restando che i criteri di Rotterdam rappresentano tuttora la fonte più condivisa nel porre diagnosi di PCOs. Ulteriori problematiche si presentano se consideriamo che la patologia di nostro interesse di fatto rappresenta una *sindrome* ed in quanto tale non potrebbe essere definita dal punto di vista diagnostico con singoli criteri.

Dall'analisi dei criteri emerge come la comunità scientifica non abbia attribuito significato diagnostico ad alterazioni endocrine frequentemente associate alla PCOs. In particolare, le alterazioni che investono l'asse ipotalamo-ipofisario, quali l'iperincretazione di LH e le anomalie proprie della sindrome metabolica non appaiono neanche in forma di criteri minori. Di qui, la necessità di delineare percorsi diagnostici che restino, da un lato, aderenti alle valutazioni richieste dai criteri ma che, dall'altro, non sottostimino la presenza di condizioni cliniche potenzialmente rilevanti. Alla luce della letteratura e della pratica clinica, si ritiene che un approccio

diagnostico ragionevole non possa prescindere da quanto brevemente riportato qui di sotto. E' opportuno sottolineare, tuttavia, che la scelta dei singoli esami di laboratorio e delle indagini strumentali va personalizzata e resta subordinata ad un corretto inquadramento anamnestico e ad un completo esame obiettivo.

Il primo aspetto che va considerato nell'inquadramento diagnostico della paziente con sospetta PCOs è l'*anovulazione*. Per validare la presenza dell'ovulazione si ricorre ad indagini ultrasonografiche ed ormonali. Attraverso ecografie seriate, ripetute ad intervalli regolari, si può valutare la crescita del follicolo e le modificazioni che avvengono a livello endometriale. I dosaggi ormonali, d'altra parte, vengono effettuati per controllare che alla crescita follicolare corrisponda un'adeguata produzione di ormoni. Il dosaggio di progesterone, da effettuarsi intorno al 20°-25° giorno del ciclo, in base alle evidenze ultrasonografiche, risulta essere dirimente per la diagnosi di avvenuta ovulazione: livelli superiori a 5 ng/ml confermano tale fenomeno. Prima del 14° giorno può essere indicata la rilevazione sierica di E₂ e di LH al fine di valutare la presenza del picco pre-ovulatorio.

Il secondo aspetto della *Consensus Conference* di Rotterdam è il riscontro di *iperandrogenismo clinico e/o biochimico*. E' quindi importante un dosaggio di ormoni androgeni (testosterone libero, diidrotestosterone, DHEA-S e 17-OH progesterone) da effettuarsi in fase follicolare precoce. Questo assume una rilevanza particolare se si considera che la PCOs è caratterizzata da un incremento della quota di testosterone libero (per riduzione dei livelli di SHBG) e da un incremento dei livelli di diidrotestosterone in circa il 40% dei casi.

Per la diagnosi di iperandrogenismo clinico si ricorre allo *score* di Ferriman-Gallwey. In figura 2 sono indicate le aree corporee che vengono valutate nella diagnosi clinica di irsutismo. Per ogni singola zona, l'operatore attribuisce secondo valutazione soggettiva un punteggio da 0 a 4 sulla base della quantità di peluria presente. Infine si sommano i singoli punteggi per ottenere il punteggio globale e definitivo.



Figura 3.2. *Score* di Ferriman-Gallwey (Ferriman and Gallwey, 1961)

Punteggi superiori a 8 indicano in genere situazioni non fisiologiche e sono compatibili con l'irsutismo da PCOs.

Nell'inquadramento diagnostico della paziente iperandrogenica è cruciale escludere le possibili altre cause di irsutismo. A livello ovarico, oltre la PCOs, altre cause di irsutismo sono rappresentate da tumori virilizzanti, quali l'arrenoblastoma, i tumori delle cellule della teca ed i tumori delle cellule della granulosa. In questi casi è fondamentale valutare i livelli sierici del testosterone. In presenza di concentrazioni >2 ng/ml è possibile sospettare una patologia di origine neoplastica, in special modo quando la condizione di iperandrogenismo si instaura in breve tempo (2-6 mesi). Tra le altre possibili cause di iperandrogenismo particolare rilevanza assume, in relazione all'incidenza, la sindrome adrenogenitale da difetto enzimatico, congenito od acquisito, totale o parziale. L'enzima maggiormente coinvolto è la 21-idrossilasi. La mancata attività dell'enzima impedisce la produzione di glico- e mineralcorticoidi; ne deriva uno *switch* dei precursori steroidei verso la formazione di ormoni androgeni. Nel caso della patologia congenita, questa si manifesta in epoca prepubere ed in genere si associa a segni di virilizzazione. Nel caso della sindrome adrenogenitale

acquisita, dovuta a neoplasie adreno-secermenti, il quadro clinico si instaura in tempi estremamente brevi. Infine, bisogna escludere un irsutismo idiopatico legato a fattori genetici e razziali di aumentata attività della 5 α -reduttasi.

Nella diagnosi differenziale fra PCOs e patologia surrenalica, è fondamentale il dosaggio del 17-OH progesterone. Normalmente il 17-OH progesterone di origine ovarica tende ad aumentare durante la seconda fase del ciclo mestruale, insieme al progesterone, poiché è sintetizzato dal corpo luteo. Sebbene l'ormone frequentemente risulti elevato in soggetti affetti da PCOs (un valore >50 ng/dl è suggestivo di iperandrogenismo), la rilevazione di valori superiori a 200 ng/dl in fase follicolare giustifica gli approfondimenti diagnostici necessari per escludere disfunzioni endocrinologiche alternative come l'iperplasia surrenalica (Azziz *et al.*, 1994). In questi casi è indicato eseguire un test da stimolo con l'ACTH. Dopo la somministrazione intramuscolare di 0,25 mg di Tetracosactide Esacetato [Synacthen, Novartis Farma, Origgio (VA), Italia] si dosano ai tempi 0', 30' e 60' gli ormoni 17-OH progesterone e cortisolo.

Il terzo criterio considerato nella *Consensus Conference* di Rotterdam è l'*aspetto ecografico* della gonade. L'argomento, oggetto ancora oggi di numerose rivisitazioni, merita un approfondimento particolare; pertanto rimandiamo alla sezione specifica.

3.3 Il ruolo dell'ecografia

Il carattere indubbiamente “innovativo” della *Consensus Conference* di Rotterdam del 2003 è rappresentato dall'introduzione del “parametro morfologico” come *parte integrante ed imprescindibile* del percorso diagnostico-terapeutico della paziente PCOs. Al dibattito avvenuto durante la conferenza olandese si deve infatti l'introduzione di due nuove tipologie di pazienti, precedentemente non contemplate nei criteri NIH del 1990. Oltre che alla condizione “classica”, contrassegnata dall'anovulazione associata ad iperandrogenismo, vengono per la prima volta riconosciuti fenotipi caratterizzati dalla presenza di ovaie policistiche. Più specificamente, la presenza di tale quadro in associazione ad anche uno solo dei due

precedenti criteri viene ritenuta sufficiente ai fini della diagnosi. Questo sottolinea fortemente il ruolo dell'ecografia nell'approfondimento diagnostico della paziente PCOs.

Il reperto ecografico di policistosi ovarica non è patognomonico di PCOs; al contrario si può affermare che tutte le condizioni nelle quali si instaura un fenomeno anovulatorio possano riflettersi in alterazioni morfologiche *PCO-like*. Esplicativo è l'esempio dell'amenorrea nell'adolescente post-pubere, in cui sono frequenti episodi di anovulazione transitoria, difficilmente distinguibili da quella cronica. Il quadro anovulatorio è ulteriormente complicato dal fatto che l'aspetto ultrasonografico della gonade è istologicamente simile all'ovaio policistico, per l'aumentato volume e la presenza di un elevato numero di follicoli antrali.

In presenza di iperandrogenismo e disordini mestruali, l'ecografia può essere dunque considerata la tecnica *gold standard* per la diagnosi della sindrome.

Secondo le attuali raccomandazioni (Pache *et al.*, 1992; Van Santbrink *et al.*, 1997; Jonard *et al.*, 2003), i criteri aventi sufficiente specificità e sensibilità (Balen *et al.*, 2003) nel definire la presenza di PCOs, sono:

- la presenza di 12 o più follicoli in ciascun ovaio;
- Il diametro dei follicoli compreso tra i 2 ed i 9 mm;
- e/o volume ovarico aumentato (>10 ml).

Attenendoci alle indicazioni poste nel corso del congresso di Rotterdam, appare evidente che la diagnosi ecografica di Ovaio Policistico tiene conto esclusivamente della valutazione del *volume ovarico* e del *numero di follicoli*. Sono dunque escluse dalla valutazione ecografica variabili individuali quali distribuzione dei follicoli,

espansione dello stroma e delle caratteristiche vascolari dell'organo. Benché l'incremento del volume dello stroma sia una caratteristica tipica della policistosi ovarica (Buckley *et al.*, 1999), è stato dimostrato come la misurazione del volume ovarico costituisca una valida alternativa nella sua quantificazione nella pratica clinica (Dewailly *et al.*, 1994).

L'aspetto ecografico classico di gonade policistica è rappresentato da un organo di forma prevalentemente allungata e con abbondante stroma nella regione intratecale; i follicoli, visibili all'ecografia come aree ipo-anecogene di forma rotondeggiante, sono situati prevalentemente alla periferia dell'organo e si dispongono secondo un'architettura definita da alcuni autori come “corona di rosario” o “filo di perle”. In figura 3 è possibile osservare l'aspetto ultrasonografico di policistosi ovarica. Nel suo contesto, in particolare, si evidenziano multipli follicoli, a caratteristiche anecogene, disposti prevalentemente in sede corticale, e lo stroma iperecogeno, abbondante in sede ilare.

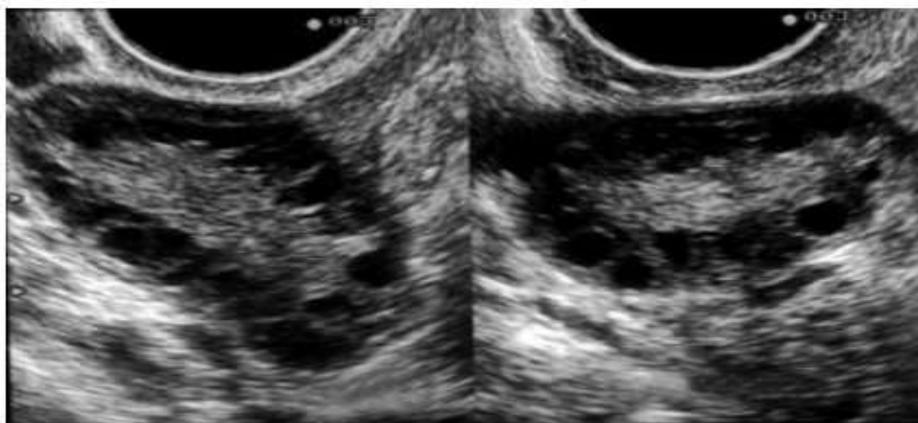


Figura 3.3. Quadro ultrasonografico di PCOs (Balen *et al.*, 2003)

Anche la presenza di un unico ovaio con le caratteristiche sopra descritte ci autorizza a fare diagnosi di PCOs. E' interessante notare che sono stati descritti alcuni casi di ovaie policistiche unilaterali ed ovaie policistiche parziali (Battaglia *et al.*, 1999a; 1999b).

La necessità di introdurre nuove strategie per la classificazione e la validazione ecografica della PCOs è nata dall'osservazione che le immagini ultrasonografiche di micropolicistici ovarica possono non differire sostanzialmente dall'aspetto ecografico di una gonade normale. Nonostante i criteri di Rotterdam rimangano i più utilizzati, altrettanto attendibili, per esempio, sono ritenuti quelli proposti precedentemente da Adams *et al.* [presenza di ovaie di volume aumentato ($>8 \text{ cm}^3$) e presenza di piccole (2-8 mm), multiple (≥ 10) cisti periferiche distribuite attorno ad un nucleo di stroma ecodenso (Adams *et al.* 1985)].

Nel tentativo di incrementare l'efficacia diagnostica dell'ecografia nell'inquadramento clinico della PCOs, Fulghesu e collaboratori hanno proposto il *rapporto area dello stroma/area dell'ovaio* (S/A) (Fulghesu *et al.*, 2001), osservando come in pazienti PCOs questo parametro risulti aumentato rispetto a quadri di ovaio multifollicolare, dove i follicoli sono prevalentemente distribuiti nell'intero contesto del parenchima. Si considera positivo ai fini della diagnosi morfologica un *cut-off* di 0.34. Esso mostra un coefficiente di variabilità inter-operatore inferiore al 5% mostrandosi quindi estremamente affidabile. Tale parametro, inoltre, presenta una sensibilità ed una specificità pari al 100% risultando dirimente nella diagnosi differenziale delle forme di “ovaio multifollicolare”. Nella valutazione diagnostica tale parametro è quello che correla meglio con la variabile iperandrogenismo. Questo rappresenta senza dubbio un ulteriore passo in avanti nel perfezionamento della capacità diagnostica ecografica perché affianca ai parametri già validati dalla letteratura scientifica internazionale lo studio dello stroma ed i principali aspetti endocrini della sindrome. La coesistenza di differenti criteri e nuove proposte di inquadramento ecografico dell'ovaio policistico riflettono il clima di incertezza e la necessità di identificare nuove strade atte ad aumentare la sensibilità della diagnosi ultrasonografica di PCOs.

III Linea di Ricerca:

Nuove strategie di inquadramento diagnostico ed approccio terapeutico in pazienti affette da Sindrome dell'ovaio Policistico

Basi di partenza scientifica

La PCOs è un'endocrinopatia caratterizzata clinicamente da anovulazione, iperandrogenismo ed oligomenorrea; prima di ogni ulteriore approfondimento va chiarita la differenza nella definizione fra PCOs e policistosi ovarica, secondo cui quest'ultima risulta solo un aspetto caratteristico ma non esclusivo della sindrome in oggetto. Sebbene l'insorgenza della PCOs si associ generalmente ad alterazioni caratteristiche dell'ovaio, a lungo nelle procedure diagnostiche della sindrome non c'è stato un riferimento diretto all'osservazione ecografica delle gonadi stesse. L'analisi ecografica dell'ovaio di tipo policistico rivela un aumento del volume della gonade stessa, unitamente all'incremento del numero di follicoli nell'intorno della corteccia ed alla presenza di uno stroma ovarico nettamente iperrecogeno (Adams *et al.*, 1985). Nell'ultimo decennio le procedure diagnostiche volte alla definizione della PCOs hanno subito diverse variazioni, in virtù soprattutto dell'avanzamento tecnologico dell'*imaging* e della possibilità di approccio transvaginale, con conseguente aumento della precisione nella definizione dell'ovaio policistico. Tali continue ridefinizioni dei criteri diagnostici hanno trovato una sintesi nella *Consensus Conference* di Rotterdam (2003), i cui lavori terminarono con l'inclusione dei caratteri ultrasonografici dell'ovaio nelle linee guida della diagnosi; allo stato attuale la presenza di PCOs è, quindi, subordinata all'insorgenza contemporanea di almeno due caratteri fra anovulazione cronica, iperandrogenismo biochimico e/o clinico ed aspetto policistico di almeno un ovaio. I più recenti ed autorevoli studi sulle valutazioni "prodromiche" della PCOs sono stati focalizzati sull'osservazione per via ecografica del volume ovarico e stromale, sebbene con risultati a volte poco riproducibili e standardizzabili nella pratica clinica; analogamente, lo studio dei

parametri ormonali, sebbene promettente, si è rivelato oggetto di controversie in ambito scientifico.

Il riscontro di insulino-resistenza nelle pazienti affette da PCOs ha una prevalenza del 70% (Burghen *et al.*, 1980) ma la relazione di causa/effetto non è ancora definitivamente accettata, né inserita come parametro di inquadramento diagnostico. Il ruolo delle variabili di natura ormonale è stato, tuttavia, sempre ridimensionato nell'ottica di una definizione di percorsi clinici fluidi e standardizzati, come dimostra la completa assenza dell'insulino-resistenza e della sindrome metabolica all'interno delle linee definite dalla *Consensus* di Rotterdam. D'altra parte sono verificate, da numerose ed indipendenti linee di ricerca, le caratteristiche peculiari dei meccanismi patogenetici, associati a PCOs, originati da fenomeni d'insulino-resistenza e da altri quadri sindromici, quali forme di iperandrogenismo biochimico e/o clinico.

Nel corso degli ultimi anni, ha iniziato a prendere corpo l'idea che forme di PCOs contrassegnate da insulino-resistenza rappresentino l'esito di meccanismi patogenetici peculiari e, verosimilmente, distinguibili dalle espressioni prettamente iperandrogeniche. Dalla conferma di tale presupposto, deriverebbero percorsi clinici, e soprattutto approcci terapeutici, differenti in relazione alla natura *etiologica* della patologia. Il presente lavoro è stato pertanto incentrato sull'ipotesi che meccanismi patogenetici distinti possano riflettersi in alterazioni morfologiche specifiche, ovvero in differenti aspetti ecografici dell'ovaio policistico. Di conseguenza, si è voluto valutare, in un disegno osservazionale, l'effetto dell'iperinsulinismo sui parametri ultrasonografici ovarici in pazienti affette da PCOs utilizzando come popolazione di controllo una coorte di donne affette dalla sindrome medesima non associata ad iperinsulinemia. Casi e controlli sono stati selezionati in base all'aderenza ai criteri di Rotterdam. Al fine di ottenere ulteriori informazioni circa l'ipotesi di meccanismi patogenesi diversi, si è anche provveduto, in un sottogruppo di pazienti, ad analisi comparativa dei livelli sierici di AMH.

Obiettivo dello studio

L'obiettivo dello studio si basa sull'ipotesi che differenti meccanismi patogenetici possano generare dei quadri ecografici di PCOs dissimili.

Dunque, in un primo momento sarà esaminato l'aspetto ecografico delle gonadi di pazienti iperinsulinemiche affette da PCOs rispetto a donne affette dalla stessa sindrome ma in assenza di insulino-resistenza (popolazione di controllo). Casi e controlli saranno selezionati in base all'aderenza ai criteri di Rotterdam.

In una seconda fase dello studio, per avvalorare l'ipotesi che esistano dei meccanismi patogenetici di base differenti all'interno dello stesso quadro sindromico, in un sottogruppo di pazienti saranno comparati i livelli plasmatici di AMH.

Nella terza fase dello studio, si valuterà l'effetto dell'iperinsulinismo sul quadro ultrasonografico mettendo a confronto pazienti affette da PCOs iperinsulinemiche con donne affette dalla medesima sindrome non associata ad iperinsulinemia.

Nella quarta ed ultima fase del lavoro, sarà messa a confronto la risposta ovarica delle pazienti candidate a tecniche di PMA appartenenti ai due differenti quadri morfologici di PCOs ipotizzati.

RISULTATI III LINEA DI RICERCA

The effect of FT500 Plus(®) on ovarian stimulation in PCOS women.

Reprod Toxicol. 2016

Alviggi C, Cariati F, Conforti A, De Rosa P, Vallone R, Strina I, Pivonello R, De Placido G.

The Distribution of Stroma and Antral Follicles Differs between Insulin-Resistance and Hyperandrogenism-Related Polycystic Ovarian Syndrome.

Front Endocrinol (Lausanne). 2017.

Alviggi C, Conforti A, De Rosa P, Strina I, Palomba S, Vallone R, Gizzo S, Borrelli R, Andersen CY, De Placido G, Guerriero S.

Bibliografia

- ACHREKAR, S. K., MODI, D. N., DESAI, S. K., MANGOLI, V. S., MANGOLI, R. V. & MAHALE, S. D. 2009a. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (Thr307Ala) is associated with variable ovarian response and ovarian hyperstimulation syndrome in Indian women. *Fertil Steril*, 91, 432-9.
- ACHREKAR, S. K., MODI, D. N., DESAI, S. K., MANGOLI, V. S., MANGOLI, R. V. & MAHALE, S. D. 2009b. Poor ovarian response to gonadotrophin stimulation is associated with FSH receptor polymorphism. *Reprod Biomed Online*, 18, 509-15.
- ALTMÄE, S., HOVATTA, O., STAVREUS-EVERS, A. & SALUMETS, A. 2011. Genetic predictors of controlled ovarian hyperstimulation: Where do we stand today? *Human Reproduction Update*, 17, 813-828.
- ALVIGGI, C., ANDERSEN, C. Y., BUEHLER, K., CONFORTI, A., DE PLACIDO, G., ESTEVES, S. C., FISCHER, R., GALLIANO, D., POLYZOS, N. P., SUNKARA, S. K., UBALDI, F. M. & HUMAIDAN, P. 2016a. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertil Steril*, 105, 1452-3.
- ALVIGGI, C., CLARIZIA, R., MOLLO, A., RANIERI, A. & DE PLACIDO, G. 2011a. Who needs LH in ovarian stimulation? *Reprod Biomed Online*, 22 Suppl 1, S33-41.
- ALVIGGI, C., CLARIZIA, R., PETTERSSON, K., MOLLO, A., HUMAIDAN, P., STRINA, I., COPPOLA, M., RANIERI, A., D'UVA, M. & DE PLACIDO, G. 2009a. Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reprod Biomed Online*, 18, 9-14.
- ALVIGGI, C., CLARIZIA, R., PETTERSSON, K., MOLLO, A., HUMAIDAN, P., STRINA, I., COPPOLA, M., RANIERI, A., D'UVA, M. & DE PLACIDO, G. 2011b. Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reprod Biomed Online*, 22 Suppl 1, S67-72.
- ALVIGGI, C., CONFORTI, A., CAPRIO, F., GIZZO, S., NOVENTA, M., STRINA, I., PAGANO, T., DE ROSA, P., CARBONE, F., COLACURCI, N. & DE PLACIDO, G. 2016b. In Estimated Good Prognosis Patients Could Unexpected "Hyporesponse" to Controlled Ovarian Stimulation be Related to Genetic Polymorphisms of FSH Receptor? *Reprod Sci*, 23, 1103-8.
- ALVIGGI, C., CONFORTI, A., CARIATI, F., ALFANO, S., STRINA, I., HUHTANIEMI, I. & HUMAIDAN, P. 2016c. Abstracts of the 32nd Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. *Human Reproduction*, 31, i1-i513.
- ALVIGGI, C., CONFORTI, A. & ESTEVES, S. C. 2015. Impact of mutations and polymorphisms of gonadotrophins and their receptors on the outcome of controlled ovarian stimulation. *Principles and Practice of Controlled Ovarian Stimulation in ART*.
- ALVIGGI, C., CONFORTI, A., FABOZZI, F. & DE PLACIDO, G. 2009b. Ovarian stimulation for IVF/ICSI cycles: A pharmacogenomic approach. *Medecine Therapeutique Medecine de la Reproduction, Gynecologie et Endocrinologie*, 11, 271-277.
- ALVIGGI, C., PETTERSSON, K., LONGOBARDI, S., ANDERSEN, C. Y., CONFORTI, A., DE ROSA, P., CLARIZIA, R., STRINA, I., MOLLO, A., DE PLACIDO, G. & HUMAIDAN, P. 2013. A common polymorphic allele of the LH beta-subunit gene is associated with higher exogenous FSH consumption during controlled ovarian stimulation for assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol*, 11, 51.
- BEHRE, H. M., GREB, R. R., MEMPEL, A., SONNTAG, B., KIESEL, L., KALTWAßER, P., SELIGER, E., RÖPKE, F., GROMOLL, J., NIESCHLAG, E. & SIMONI, M. 2005. Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-

- stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: A pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation. *Pharmacogenetics and Genomics*, 15, 451-456.
- CASARINI, L., MORIONDO, V., MARINO, M., ADVERSI, F., CAPODANNO, F., GRISOLIA, C., LA MARCA, A., LA SALA, G. B. & SIMONI, M. 2014. FSHR polymorphism p.N680S mediates different responses to FSH in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, 393, 83-91.
- CASARINI, L., SANTI, D. & MARINO, M. 2015. Impact of gene polymorphisms of gonadotropins and their receptors on human reproductive success. *Reproduction*, 150, R175-84.
- CONFORTI, A., ALFANO, S., DE ROSA, P., ALVIGGI, C. & DE PLACIDO, G. 2017. The role of gonadotropin polymorphisms and their receptors in assisted reproductive technologies and controlled ovarian stimulation: A prospective observational study. *Italian Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 29, 15-21.
- DAELEMANS, C., SMITS, G., DE MAERTELAER, V., COSTAGLIOLA, S., ENGLERT, Y., VASSART, G. & DELBAERE, A. 2004. Prediction of severity of symptoms in iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome by follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 6310-5.
- DE CASTRO, F., MORÓN, F. J., MONTORO, L., GALÁN, J. J., PÉREZ- HERNÁNDEZ, D., SÁNCHEZ-CASAS PADILLA, E., RAMÍREZ-LORCA, R., REAL, L. M. & RUIZ, A. 2004. Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait. *Pharmacogenetics*, 14, 285-293.
- DE CASTRO, F., RUIZ, R., MONTORO, L., PÉREZ-HERNÁNDEZ, D., SÁNCHEZ-CASAS PADILLA, E., REAL, L. M. & RUIZ, A. 2003. Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertility and Sterility*, 80, 571-576.
- DE PLACIDO, G., ALVIGGI, C., PERINO, A., STRINA, I., LISI, F., FASOLINO, A., DE PALO, R., RANIERI, A., COLACURCI, N. & MOLLO, A. 2005. Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (rFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to rFSH. A multicentre, prospective, randomized controlled trial. *Hum Reprod*, 20, 390-6.
- DESAI, S. S., ACHREKAR, S. K., PARANJAPE, S. R., DESAI, S. K., MANGOLI, V. S. & MAHALE, S. D. 2013. Association of allelic combinations of FSHR gene polymorphisms with ovarian response. *Reprod Biomed Online*, 27, 400-6.
- DESAI, S. S., ACHREKAR, S. K., PATHAK, B. R., DESAI, S. K., MANGOLI, V. S., MANGOLI, R. V. & MAHALE, S. D. 2011. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (G-29A) is associated with altered level of receptor expression in Granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 96, 2805-12.
- FERRARETTI, A. P., GIANAROLI, L., MAGLI, M. C., D'ANGELO, A., FARFALLI, V. & MONTANARO, N. 2004. Exogenous luteinizing hormone in controlled ovarian hyperstimulation for assisted reproduction techniques. *Fertil Steril*, 82, 1521-6.
- FERRARETTI, A. P., LA MARCA, A., FAUSER, B. C., TARLATZIS, B., NARGUND, G. & GIANAROLI, L. 2011. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod*, 26, 1616-24.
- GENRO, V. K., MATTE, U., DE CONTO, E., CUNHA-FILHO, J. S. & FANCHIN, R. 2012. Frequent polymorphisms of FSH receptor do not influence antral follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone administration as assessed by the Follicular Output RaTe (FORT). *J Assist Reprod Genet*, 29, 657-63.
- GIZZO, S., ANDRISANI, A., NOVENTA, M., MANFE, S., OLIVA, A., GANGEMI, M., NARDELLI, G. B. & AMBROSINI, G. 2015. Recombinant LH supplementation during IVF cycles with a GnRH-antagonist in estimated poor responders: A cross-matched pilot investigation of the optimal daily dose and timing. *Mol Med Rep*, 12, 4219-29.
- GIZZO, S., QUARANTA, M., ANDRISANI, A., BORDIN, L., VITAGLIANO, A., ESPOSITO, F., VENTURELLA, R., ZICCHINA, C., GANGEMI, M. & NOVENTA, M. 2016. Serum Stem Cell Factor Assay in Elderly Poor Responder Patients Undergoing IVF: A New Biomarker to Customize Follicle Aspiration Cycle by Cycle. *Reprod Sci*, 23, 61-8.
- GREB, R. R., GRIESHABER, K., GROMOLL, J., SONNTAG, B., NIESCHLAG, E., KIESEL, L. &

- SIMONI, M. 2005b. A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 4866-72.
- HAAVISTO, A. M., PETTERSSON, K., BERGENDAHL, M., VIRKAMAKI, A. & HUHTANIEMI, I. 1995. Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 80, 1257-63.
- HUANG, S., YANG, J., YIN, T., XING, L. I., JIE, L. I. & XU, W. 2010. Association of gene polymorphism of follicle stimulating hormone receptor with ovarian response in IVF cycles. *Medical Journal of Wuhan University*, 31, 334-338.
- HUANG, X., LI, L., HONG, L., ZHOU, W., SHI, H., ZHANG, H., ZHANG, Z., SUN, X. & DU, J. 2015. The Ser680Asn polymorphism in the follicle-stimulating hormone receptor gene is associated with the ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 82, 577-83.
- HUMAIDAN, P., ALVIGGI, C., FISCHER, R. & ESTEVES, S. C. 2016. The novel POSEIDON stratification of 'Low prognosis patients in Assisted Reproductive Technology' and its proposed marker of successful outcome. 5, 2911.
- JUN, J. K., YOON, J. S., KU, S. Y., CHOI, Y. M., HWANG, K. R., PARK, S. Y., LEE, G. H., LEE, W. D., KIM, S. H., KIM, J. G. & MOON, S. Y. 2006. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *J Hum Genet*, 51, 665-70.
- LAZAROS, L. A., HATZI, E. G., PAMPORAKI, C. E., SAKALOGLOU, P. I., XITA, N. V., MARKOULA, S. I., STEFOS, T. I., ZIKOPOULOS, K. A. & GEORGIU, I. A. 2012. The ovarian response to standard gonadotrophin stimulation depends on FSHR, SHBG and CYP19 gene synergism. *J Assist Reprod Genet*, 29, 1185-91.
- LINDGREN, I., BAATH, M., UVEBRANT, K., DEJMEK, A., KJAER, L., HENIC, E., BUNGUM, M., BUNGUM, L., CILIO, C., LEIJONHUFVUD, I., SKOUBY, S., ANDERSEN, C. Y. & GIWERCMAN, Y. L. 2016. Combined assessment of polymorphisms in the LHCGR and FSHR genes predict chance of pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Reprod*, 31, 672-83.
- NILSSON, C., PETTERSSON, K., MILLAR, R. P., COERVER, K. A., MATZUK, M. M. & HUHTANIEMI, I. T. 1997. Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. International Collaborative Research Group. *Fertil Steril*, 67, 998-1004.
- PEREZ MAYORGA, M., GROMOLL, J., BEHRE, H. M., GASSNER, C., NIESCHLAG, E. & SIMONI, M. 2000. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 3365-9.
- PETTERSSON, K., DING, Y. Q. & HUHTANIEMI, I. 1991. Monoclonal antibody-based discrepancies between two-site immunometric tests for lutropin. *Clin Chem*, 37, 1745-8.
- PETTERSSON, K., DING, Y. Q. & HUHTANIEMI, I. 1992. An immunologically anomalous luteinizing hormone variant in a healthy woman. *J Clin Endocrinol Metab*, 74, 164-71.
- PETTERSSON, K. S. & SODERHOLM, J. R. 1990. Ultrasensitive two-site immunometric assay of human lutropin by time-resolved fluorometry. *Clin Chem*, 36, 1928-33.
- ROTTERDAM 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 81, 19-25.
- SUDO, S., KUDO, M., WADA, S., SATO, O., HSUEH, A. J. & FUJIMOTO, S. 2002. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod*, 8, 893-9.
- TOHLOB, D., ABO HASHEM, E., GHAREEB, N., GHANEM, M., ELFARAHATY, R., BYERS, H., PEMBERTON, P., ROBERTS, S. A., NEWMAN, W. G. & MOHIYIDDEEN, L. 2016. Association of a promoter polymorphism in FSHR with ovarian reserve and response to ovarian stimulation in women undergoing assisted reproductive treatment. *Reprod Biomed Online*, 33, 391-7.
- WELLS, G., SHEA, B., O'CONNELL, D., PETERSON, J., WELCH, V., LOSOS, M. & TUGWELL, P. 2004. Quality Assessment Scales for Observational Studies. *Ottawa Health Research Institute*

- YAN, Y., GONG, Z., ZHANG, L., LI, Y., LI, X., ZHU, L. & SUN, L. 2013. Association of follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms with ovarian response in Chinese women: a prospective clinical study. *PLoS One*, 8, e78138.
- YIN, Q., LI, Y., HUANG, J. & YANG, D. 2015. [Association of rs13405728 polymorphism of LHR gene with slow ovarian response]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 32, 840-3.