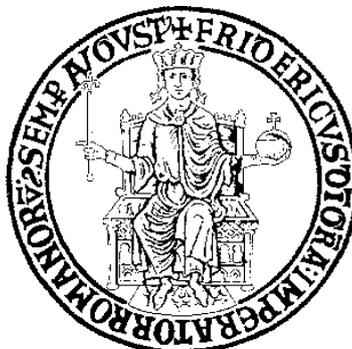


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICO II



**Dottorato in Neuroscienze XXXIV ciclo**  
Coordinatore del Dottorato  
Ch.mo Prof. Maurizio Tagliatela

**Dipartimento di Neuroscienze, Scienze  
Riproduttive ed Odontostomatologiche**

**RESEArch on ovarian reseRVE among Neurologic  
patients: the RESERVEN study**

**RELATORE**  
Ch.mo Prof.  
Carlo Alviggi

**CANDIDATO**  
Luigi Carbone

**CORSO ACCADEMICO 2018/2021**

Al futuro, perché come dissi il giorno della mia laurea “Dicett o’ pappice vicin’ a noce, ramm’o  
tiemp ca te spertos!”  
Alla mia famiglia,  
A Raffaella,

# Sommario

<b>INTRODUZIONE</b> .....	4
<b>CAPITOLO 1</b> .....	7
<b>SCLEROSI MULTIPLA</b> .....	7
1.1 Epidemiologia .....	7
1.2 Eziologia .....	8
1.3 Patogenesi .....	8
1.4 Diagnosi .....	9
1.5 Trattamento .....	10
<b>CAPITOLO 2</b> .....	12
<b>SCLEROSI MULTIPLA E COMPLICANZE GINECOLOGICHE</b> .....	12
2.1 Menarca e Pubertà .....	13
2.2 Alterazioni dell'asse Ipotalamo-Ipofisi .....	13
2.3 Gravidanza .....	14
2.4 Effetto dei farmaci sulla fertilità, gravidanza e allattamento .....	16
2.5 Menopausa .....	19
2.6 Disfunzioni-sessuali .....	20
2.7 Endometriosi .....	22
2.8 Infezioni Ginecologiche .....	23
2.9 Cancro .....	23
<b>CAPITOLO 3</b> .....	25
<b>RISERVA OVARICA</b> .....	25
3.1 FSH basale .....	26
3.2 17- $\beta$ -Estradiolo .....	27
3.3 Inibina B .....	27
3.4 Test di stimolazione con citrato di clomifene (CCCT) .....	28
3.5 Ormone Anti-Mülleriano (AMH) .....	28
3.6 Conta dei follicoli antrali (AFC) .....	30
3.7 Confronto tra AMH e AFC .....	31
3.8 Volume Ovarico .....	33
<b>CAPITOLO 4</b> .....	34
<b>STRATEGIE DI PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ</b> .....	34

4.1 Le principali procedure di preservazione della fertilità.....	35
4.1.1 Crioconservazione degli ovociti maturi.....	36
<b>CAPITOLO 5.....</b>	<b>38</b>
<b>SEZIONE SPERIMENTALE .....</b>	<b>38</b>
5.1 Basi scientifiche.....	38
5.2 Obiettivi.....	39
5.3 Materiali e metodi.....	39
5.4 Analisi statistica.....	43
5.5 Risultati.....	43
5.6 Discussione.....	45
5.7 Conclusioni.....	48
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>50</b>

## INTRODUZIONE

La Sclerosi Multipla (SM) è una patologia neurologica cronica autoimmune caratterizzata da un severo grado di disabilità, da 2 a 3 volte più frequente nelle donne rispetto agli uomini. Spesso diagnosticata in età giovane adulta, con un picco di incidenza tra i 20 ed i 45 anni, può rappresentare un ostacolo alla pianificazione familiare dei soggetti, soprattutto per il sesso femminile (Poser et al., 1982).

Non si conosce fino a che punto la mancanza di figli nelle pazienti rifletta una base biologica o piuttosto un modello comportamentale. Sicuramente vi è una maggiore preoccupazione che la gravidanza possa esitare in un aborto, o la paura della trasmissione ereditaria della patologia o ancora che la progressione della malattia possa divenire un ostacolo per prendersi cura dei loro bambini o un ostacolo all'allattamento (Ghezzi et al., 2008). Non bisogna sottovalutare un aspetto influente della Sclerosi Multipla sulla vita di coppia: le disfunzioni sessuali, molto spesso non dichiarate dalle pazienti ma che hanno un impatto negativo sulla qualità della vita. Le donne con sclerosi Multipla riferiscono riduzione della libido, difficoltà nel raggiungere l'orgasmo, riduzione delle sensazioni tattili originate dalle regioni della coscia e dei genitali e secchezza vaginale con conseguente dispareunia (Cavalla et al., 2006). L'approccio con il partner può essere influenzato anche da fattori psicosociali oltre che fisici, secondari alla malattia o all'uso di farmaci come la depressione, bassa autostima, distorsione della propria immagine corporea e sensazione di essere meno attraenti o di non essere in grado di soddisfare il proprio partner (Delaney et al., 2017). Gli studi degli ultimi anni hanno permesso un inquadramento multifattoriale identificando tutti i fattori biologici, ambientali, psicosociali sopracitati che potrebbero svolgere un ruolo chiave nella procreazione e che andrebbero considerati nella consulenza ginecologica per ottenere un quadro completo della condizione della paziente e del suo potenziale riproduttivo al di là del suo stato neurologico (Amato et al., 2017).

Se in passato, tra i principali motivi della difficoltà a concepire, si annoveravano principalmente la disabilità stessa, con sequele fisiche e psicologiche sul soggetto affetto e le terapie utilizzate per il trattamento della patologia, con possibile effetto teratogeno, oggi il quadro sta virando, grazie ai miglioramenti sia in campo diagnostico che terapeutico, che garantiscono un pronto riconoscimento dei sintomi patognomonic, una più rapida diagnosi nella maggior parte dei casi, e terapie efficaci nel controllo dei sintomi e della malattia stessa. Pertanto, sempre più donne si trovano nella condizione di potersi avvicinare con maggiore speranza e confidenza all'idea di pianificazione familiare, nonostante la diagnosi di Sclerosi Multipla. È sempre più

frequente infatti, l'accesso di donne affette da Sclerosi Multipla ai programmi di cure per l'infertilità di coppia e di Procreazione Medicalmente Assistita.

Dati raccolti da un registro nazionale danese hanno dimostrato che le donne con Sclerosi Multipla sembrano avere meno o nessun figlio rispetto alle donne sane e sono più spesso trattate con tecniche di riproduzione assistita (Moberg et al., 2020).

Ad ogni modo, è ancora dibattuto se la patologia stessa sia da considerarsi fattore di rischio per infertilità o invece tali condizioni siano slegate tra loro (Cavalla et al., 2006).

Non va dimenticato, in questo senso, che uno dei principali fattori determinanti l'infertilità femminile è la riduzione del patrimonio follicolare che si realizza con l'aumentare dell'età, e con esso, l'aumentata incidenza di aneuploidie.

Si potrebbe ipotizzare che una ridotta riserva ovarica possa essere dovuta a un effetto neuroendocrino della Sclerosi Multipla. Influenze centrali della patologia sull'asse ipotalamo-ipofisi possono portare a disfunzioni dell'asse riproduttivo con quadri di iperprolattinemia, iperandrogenismo, alterazioni ormonali con livelli significativamente più alti di ormone follicolo-stimolante (FSH) e di ormone luteinizzante (LH) e livelli di estrogeni significativamente più bassi nella fase follicolare iniziale del ciclo mestruale con irregolarità mestruali e oligo-amenorrea. Inoltre, se le donne con SM hanno una ridotta fertilità, ciò potrebbe avere anche una causa autoimmune. Alcuni studi recenti hanno valutato nello specifico la riserva ovarica, osservando una riduzione della stessa rispetto a controlli sani. L'insufficienza ovarica prematura (POI) può essere associata a malattie autoimmuni diverse dalla SM. La POI potrebbe insorgere nelle donne con SM perché hanno una predisposizione genetica a sviluppare malattie autoimmuni, poiché i geni che predispongono alla SM predispongono anche ad altre malattie autoimmuni (McCombe et al., 2015). La ridotta riserva ovarica potrebbe essere anche il risultato di una terapia con farmaci gonadotossici, che impattano sulla qualità e/o quantità dei gameti.

Negli ultimi venti anni abbiamo assistito ad una rivoluzione copernicana relativa al tema della fertilità nelle pazienti oncologiche. Se analizziamo i dati del solo nostro ambulatorio, possiamo osservare come fino al 2005/2006, di fronte al quesito fertilità in pazienti oncologiche, in oltre l'80% dei casi, ci confrontavano con pazienti già a valle della chemioterapia. Quindi già con compromissione irreversibile della riserva follicolare e quindi già senza chance riproduttive. Il lavoro di questi dieci anni ci ha portato ad una totale inversione della tendenza, nel senso che se oggi intercettiamo pazienti in età riproduttiva nell'ambito del percorso oncologico, in oltre il 90% dei casi le valutiamo a monte della chemioterapia o radioterapia, quindi quando siamo ancora in tempo per adottare strategie per la preservazione della fertilità. Se è vero che in un

lasso temporale ristretto, in ambito oncologico, si è riusciti ad invertire completamente la tendenza del processo, è altresì vero che si sono delineate problematiche analoghe (non altrettanto attenzionate) sotto il profilo della patologia non oncologica. Le pazienti affette da SM rientrano in questo scenario avendo una fertilità compromessa in relazione a due aspetti fondamentali: in primis la variabile tempo in relazione all'età d'insorgenza e in secondo luogo la variabile legata all'utilizzo di farmaci gonadotossici. Proprio in relazione al primo aspetto, spesso ci confrontiamo con pazienti non ancora desiderose di prole, che non conoscono il proprio futuro in relazione all'evoluzione della malattia o alla necessità di terapie gonadotossiche, o anche eventuali quadri imprevedibili d'ingravescenza della patologia che potrebbero rendere impossibili eventuali terapie per una stimolazione ovarica controllata. Tutto questo ci fa capire come sia fondamentale e importante attribuire a pazienti con malattie cronico-degenerative la stessa rilevanza nell'ottica della preservazione della fertilità che è stata attribuita alle pazienti oncologiche.

Pertanto, in questo scenario si inserisce il seguente progetto di tesi sperimentale, partendo dall'ipotesi che esista un fattore ovarico di infertilità nelle donne affette da SM, che viene valutato attraverso l'integrazione di metodiche ultrasonografiche 3D e variabili biochimiche di ultima generazione. L'utilizzo della conta dei follicoli antrali con software ecografici di ricostruzione tridimensionale dei follicoli permette infatti di valutare la forma dei follicoli stessi ed anche il loro volume, al fine di superare la soggettività della valutazione ecografica bidimensionale; l'utilizzo inoltre di sistemi di analisi di laboratorio automatizzati permette una maggior standardizzazione anche del principale marcatore biochimico di riserva ovarica, ossia l'ormone Anti-Mülleriano, per garantire una maggiore oggettività e precisione del dato.

L'idea di fondo è quella di favorire una consapevolezza maggiore riguardo la propria fertilità e facilitare il progetto di pianificazione familiare alle donne affette da una patologia cronico-degenerativa come la Sclerosi Multipla, fornendo l'opzione della crioconservazione ovocitaria e/o di tessuto ovarico in casi selezionati.

# CAPITOLO 1

## SCLEROSI MULTIPLA

La sclerosi multipla (SM) è una malattia infiammatoria cronica del sistema nervoso centrale (SNC), a carattere demielinizzante, in cui la risposta autoimmune alle proteine della mielina, è innescata da uno o più agenti esogeni in un ospite geneticamente sensibile (Cavalla et al., 2006). È una patologia altamente invalidante con un notevole impatto sociale ed economico, seconda all'insufficienza cardiaca congestizia in termini di costi medici legati a condizioni croniche.

I pazienti con SM sopportano oneri legati alla ridotta qualità di vita e alla privazione dei diritti psicosociali, che sono amplificati dal progresso della loro malattia e, a sua volta, dalla disabilità nel tempo; infatti sebbene negli ultimi anni siano stati compiuti progressi significativi nel trattamento, la SM rimane una delle cause più frequenti di disabilità neurologica nei giovani, classificandosi al secondo posto dopo la patologia traumatica (Costello et al., 2018).

### 1.1 Epidemiologia

L'esordio della sclerosi multipla avviene solitamente tra i 20 ei 40 anni, con un picco di incidenza intorno ai 30 anni. Le donne sono colpite da due a tre volte più frequentemente degli uomini e questa differenza sembra aumentare in alcune aree del mondo.

Questo è spiegato dal fatto che le donne sono meno tolleranti per il self, con una maggiore esposizione alle patologie autoimmuni; tutto ciò non vale però in alcune fasi della vita di una donna come la gravidanza, in cui le donne hanno uno shift immunologico caratterizzato da un'alta tolleranza al self per evitare il rigetto del prodotto del concepimento.

La malattia è molto diffusa tra le popolazioni caucasiche, europee e nordamericane. L'Italia è un paese ad alta prevalenza di malattia con 113 casi ogni 100 mila abitanti. Rispetto alla popolazione generale, i pazienti con sclerosi multipla hanno un tasso di mortalità più elevato e un'aspettativa di vita più breve di circa 10 anni.

Leray et al., nel 2016 dimostrano nello studio francese "SURVIMUS" che in 27.603 pazienti con SM, nei primi 20 anni di malattia la sopravvivenza era molto simile a quella della popolazione generale. L'eccessiva mortalità si registrava dopo questo periodo portando a una riduzione dell'aspettativa di vita di circa 6-7 anni. Lo studio evidenzia anche che il 50-70% dei decessi potrebbe essere considerato correlato alla SM, come causa principale o come causa contributiva nell'ambito di disturbi psichiatrici quali il suicidio, con un tasso di suicidio tra 1.6 a 7.5 volte quello della popolazione generale (Leray et al., 2016).

## 1.2 Eziologia

Sebbene la sua eziologia rimanga sfuggente, è ormai noto che fattori ambientali e geni suscettibili siano coinvolti nella patogenesi della malattia.

Forti evidenze supportano un'associazione con infezione da virus Epstein-Barr, fumo di sigaretta, bassi livelli di vitamina D e un aumento del BMI (Body Mass Index) durante l'adolescenza. D'altra parte, Belbasis et al. hanno confermato l'assenza di qualsiasi associazione tra la SM e alcuni fattori tra cui diversi vaccini (tetano-difterite-pertosse, influenza, bacillo Calmette–Guerin (BCG), morbillo–parotite–rosolia, poliomielite, virus dell'epatite B, febbre tifoide), eventi traumatici e la presenza di allergie. Questo studio ha quindi confutato una varietà di fattori inizialmente ritenuti significativamente associati alla SM (Bebasis et al., 2015).

Ad ogni modo, risultati di studi immunologici, genetici e istopatologici supportano il concetto che l'autoimmunità giochi un ruolo importante nella patogenesi della malattia. La Sclerosi Multipla non è trasmissibile per via ereditaria, ma c'è un rischio maggiore di sviluppare la malattia se i parenti sono affetti, e il rischio aumenta proporzionalmente alla condivisione genetica. Nei paesi occidentali, il rischio per età in un bambino che ha un genitore con SM è del 2%, una cifra 15 volte superiore rispetto al rischio (0.3%) della popolazione generale. Pertanto, il rischio deve essere quantificato caso per caso, tenendo conto anche delle differenze geografiche. Il tasso di concordanza tra gemelli omozigoti è del 31%, circa 6 volte superiore a quello dei gemelli dizigoti. Studi sulla popolazione caucasica hanno evidenziato un'associazione tra SM ed espressione dell'antigene HLA-DRB1 \* 15:01, con un OR (Odds Ratio) di circa 3.

Con l'avvento degli studi di associazione genome-wide (GWAS), l'identificazione delle associazioni di un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) con i geni IL7R e IL2RA è stato un importante passo avanti. Collettivamente, queste analisi hanno identificato 110 varianti (al di fuori del complesso maggiore di istocompatibilità) associate alla suscettibilità alla SM. Queste varianti spesso implicano geni associati a processi immunologici e sono spesso correlate anche ad altre malattie autoimmuni (Leray et al., 2016).

## 1.3 Patogenesi

La base del quadro autoimmune è da ricercare nell'attivazione periferica di linfociti T CD4+ nei confronti di antigeni della sostanza bianca del sistema nervoso centrale: la proteina basica della mielina (MBP), la glicoproteina mielinica oligodendrocitaria (MOG), o la proteina proteolipidica (PLP). Ciò che ne risulta è la perdita del rivestimento mielinico degli assoni che non sono più in grado di trasmettere efficientemente il potenziale d'azione.

Questi linfociti Th1, attiverebbero una reazione infiammatoria attraverso il rilascio di citochine pro infiammatorie, come IL-2, TNF-alfa, INF-gamma, in grado di danneggiare direttamente gli oligodendrociti o la guaina mielinica, con conseguente perdita del rivestimento mielinico degli assoni che non sono più in grado di trasmettere efficientemente il potenziale d'azione.

La presenza di una seconda risposta, di tipo umorale è suggerita dall'immunoglobulina oligoclonale IgG del liquido cerebrospinale e dalla presenza di bande oligoclonali in più del 90 % dei pazienti affetti (Indice di Link > 0.6) (Barone et al. Sistema nervoso, Idelson – Gnocchi Editore, 2015).

#### 1.4 Diagnosi

La diagnosi di SM è clinica, stabilita dai criteri di McDonald (McNicholas et al., 2018), con l'evidenza di lesioni nel SNC disseminate nello spazio (DIS), sintomi/segni riconducibili ad almeno due aree del SNC tipicamente colpite da Sclerosi Multipla, e nel tempo (DIT), almeno due attacchi separati da un periodo di almeno un mese.

I criteri più recenti includono i risultati della risonanza magnetica per stabilire la presenza di DIS e DIT, che spesso consentono una diagnosi ed un trattamento precoce, quando appropriato. Numerosi sono i fattori che preannunciano una prognosi peggiore o una più rapida progressione della malattia o nella conversione da CIS (Clinically Isolated Syndrome) a SM definita, tra cui (Milo et al., 2014):

- Esordio tardivo
- Sesso maschile
- origine etnica (asiatici o afro-americani)
- presentazione iniziale con sintomi motori, cerebellari o sfinterici
- attacchi frequenti durante i primi anni della malattia
- breve intervallo tra i primi due attacchi
- rapida progressione della disabilità durante i primi anni
- malattia progressiva dall'inizio
- deterioramento cognitivo all'esordio della malattia.

Sebbene il quadro di esordio sia multifocale con parestesie o intorpidimento (20%), neurite ottica con dolore sovra-/retro-orbitario e diplopia (22%), incoordinazione e disturbi dell'andatura (andatura atasso-spastica), ipostenia e paresi di uno o più arti, capogiri e vertigini, in circa l'85% delle persone con SM si verifica un primo episodio clinico in cui il paziente presenta sintomi e segni indicativi di un disturbo infiammatorio demielinizzante del SNC, a

esordio acuto o subacuto. La durata dell'episodio deve essere di almeno 24 ore e manifestarsi in assenza di febbre o infezione, senza segni clinici di encefalopatia.

Con la risonanza magnetica, la DIS è dimostrata dalla presenza di placche di demielinizzazione a sede perivenulare, in almeno due aree non contigue del SNC tra quelle maggiormente coinvolte: aree periventricolari, i nervi ottici, corpo calloso, il tronco encefalico, cervelletto, tratto cervicale del midollo spinale.

La DIT può essere soddisfatta dimostrando la presenza di lesioni captanti (acute) e non captanti (croniche) il gadolinio sulla stessa scansione, poiché ciò dimostra che le lesioni si sono presumibilmente sviluppate in momenti diversi nel tempo (Berger et al., 2017).

## 1.5 Trattamento

Le opzioni terapeutiche disponibili per la SM sono relativamente deludenti e rimangono una sfida. Una possibile ragione di ciò è la mancanza di comprensione dei meccanismi patogenetici che guidano la patologia. Il trattamento prevede 3 tipologie di approccio terapeutico: *trattamento delle esacerbazioni*, rallentamento della progressione della malattia con *terapie modificanti la malattia* (DMT) e *terapie sintomatiche*.

Pratica consolidata tra i neurologi è il *trattamento delle esacerbazioni*, con cicli a breve termine di agenti antinfiammatori, come i corticosteroidi endovenosi o orali ad alto dosaggio. Sebbene gli steroidi non influenzino il decorso della SM e non siano esenti da effetti collaterali (ipertensione, bradicardia, iperglicemia), nel tempo hanno dimostrato di ridurre i sintomi, migliorare la funzione motoria e abbreviare il tempo degli attacchi acuti.

Le *terapie modificanti la malattia* (DMT) sono una componente della gestione a lungo termine dei pazienti con SM. L'obiettivo della modifica della malattia è ridurre l'attività clinica precoce e subclinica che si ritiene contribuisca alla disabilità a lungo termine. Il trattamento è altamente variabile e differisce in base alla gravità, al costo, ai profili degli effetti avversi (EA), al paziente, alla preferenza del medico prescrittore.

In Prima linea sono usati nella SM l'*interferone Beta*, il *glatiramer acetato*, il *dimetil-fumarato*. In Seconda linea, nelle forme SMRR (relapsing-remitting) aggressive a rapida evoluzione non rispondenti ai farmaci di prima linea, troviamo il *natalizumab* ed il *mitoxantrone*, *fingolimod* e *cladribina*.

Il *trattamento sintomatico* è mirato a gestire la sintomatologia derivante dalle lesioni (Hart et al., 2016):

- spasticità: *baclofene*, *cannabinoidi*
- dolore neuropatico: *carbamazepine*, *fenitoina*

- ritenzione urinaria: *anticolinergici*
- disfunzione sessuale: iniezione di *papaverine* o *fentolamina*
- alterazioni intestinali: *lassativi, clisteri*
- stanchezza serale: *amantidina*
- labilità emotiva: *amitriptilina*

## CAPITOLO 2

### SCLEROSI MULTIPLA E COMPLICANZE GINECOLOGICHE

I fattori ormonali sono presumibilmente coinvolti nella Sclerosi Multipla, influenzando le risposte immunitarie e contribuendo ai meccanismi di riparazione nel sistema nervoso. Gli ormoni sessuali come gli estrogeni, il progesterone, la prolattina e gli androgeni influenzano condizioni fisiologiche della vita riproduttiva della donna come il menarca, la pubertà, la gravidanza e la menopausa, essendo implicati in complesse interazioni con fattori ambientali (luce solare, vitamina D), genetici, (trasmissione degli alleli di rischio MHC) e culturali (urbanizzazione, educazione femminile). Gli estrogeni endogeni prodotti nelle femmine di mammiferi includono estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiolo (E2) ed estriolo (E3, prodotto solo in gravidanza). L'E2 è la forma predominante nelle donne in premenopausa. Il livello di estrogeni circolanti varia durante tutte le fasi della vita di una donna, a partire dall'infanzia fino alla menopausa. In ciascuna di queste fasi, i cambiamenti ormonali hanno influenze fisse sul corpo femminile. Gli estrogeni promuovono principalmente lo sviluppo delle caratteristiche sessuali secondarie femminili e regolano il ciclo mestruale. Oltre allo sviluppo sessuale, l'estradiolo influenza la funzionalità di vari organi e tessuti, inclusi la pelle, i muscoli, il tessuto adiposo, il cervello, il sistema cardiovascolare e le ossa e protegge attivamente dall'osteoporosi e da varie malattie cardiovascolari. Anche il sistema immunitario è influenzato dai livelli di estrogeni circolanti, soprattutto durante la gravidanza, quando reagisce in modo adattivo per stabilire la tolleranza fetale. Nella gravidanza fisiologica, le cellule T regolatorie materne (Treg) si espandono sia nella periferia che nella placenta, dove sopprimono la risposta allo genica aggressiva diretta contro il feto. La mancanza di cellule Treg porta al fallimento della gestazione a causa del rigetto immunologico del feto. Le cellule Treg hanno anche la capacità di sopprimere le risposte autoimmuni. L'E2 esercita principalmente effetti antinfiammatori inibendo la produzione e la segnalazione di citochine pro-infiammatorie, come TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, nonché inibendo l'attivazione delle cellule NK e inducendo l'espressione di citochine antinfiammatorie quali come IL-4, IL-10.

Tuttavia, a concentrazioni inferiori (equivalenti ai livelli del ciclo mestruale pre-ovulatorio) l'E2 stimola la produzione di TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 e l'attività delle cellule NK, probabilmente promuovendo un ambiente pro-infiammatorio. L'aumento della secrezione di IFN- $\gamma$  può essere coinvolto nella ben nota suscettibilità delle donne all'induzione di malattie autoimmuni in diversi modelli animali sperimentali, ed essere la ragione alla base della maggiore prevalenza femminile di malattie autoimmuni negli esseri umani (Maglione et al., 2019).

## 2.1 Menarca e Pubertà

Vi sono evidenze che l'età al menarca possa essere correlata all'età di insorgenza della malattia. Il menarca si verifica attualmente 1–4 mesi prima tra le donne europee nate dal 1935 per ogni decennio monitorato, probabilmente a causa dei cambiamenti nella nutrizione, nell'igiene e nelle condizioni generali di salute nelle popolazioni occidentali.

Questo risultato coincide con un aumento dell'incidenza di SM e diversi studi hanno ora dimostrato che il menarca precoce è associato a un aumento del rischio e ad una precoce insorgenza della malattia. La pubertà influisce sul decorso della SM, poiché i tassi di ricaduta aumentano nelle ragazze giovani durante il periodo peri-menarca (Ysrraelit et al., 2019).

## 2.2 Alterazioni dell'asse Ipotalamo-Ipofisi

L'assetto endocrinologico della donna con SM è il risultato della disregolazione di più assi che possono avere come effetto finale un aumento dell'incidenza di oligo-amenorrea pari al 20%, rispetto al 16% della popolazione generale (Cavalla et al., 2006).

Una condizione di sovrappeso/obesità all'età di 18-20 anni influisce sulla condizione clinica di una donna, ma non nell'infanzia o nell'età adulta. Questa evidenza è suggerita dal fatto che le vie ormonali attivate durante la pubertà e negli individui obesi hanno un impatto sul sistema immunitario. Un ruolo per i meccanismi infiammatori correlati all'adiposità è supportato da segnalazioni di marcatori di tessuto adiposo elevati nella SM, come la leptina. La leptina è una citochina che agisce sull'ipotalamo ed è nota per avere effetti pro-infiammatori oltre a effetti sul metabolismo e sull'assunzione di cibo. L'aumento della prevalenza della dieta occidentale ha portato a livelli di più alti di leptina in molte popolazioni, il che potrebbe contribuire all'aumento e al peggioramento della Sclerosi Multipla (Ysrraelit et al., 2019).

Non è noto se i meccanismi autoimmuni correlati alla SM potrebbero colpire l'ovaio, portando a un consumo consapevole della riserva ovarica, ma una situazione simile si verifica nell'ipotiroidismo autoimmune, che è anche associato a un rischio più elevato di infertilità legato a insufficienza ovarica precoce (POF) e aborto (Poppe et al., 2004).

È interessante notare che il 6-8% delle pazienti con SM ha una concomitante disfunzione tiroidea, più frequentemente ipotiroidismo. Le disfunzioni tiroidee possono alterare la salute riproduttiva della donna, determinando irregolarità dei cicli mestruali, anovulazione, infertilità e aumento del rischio di aborti spontanei e complicazioni fetali.

La T3 modula l'azione delle gonadotropine sulla steroidogenesi ovarica e recettori per la T3 sono presenti sulle cellule stromali e della granulosa e sugli oociti; alterazioni della concentrazione di T3, quindi, possono modificare la secrezione di gonadotropine, estrogeni e

androgeni. Perciò, le donne con SM potrebbero avere un certo grado di predisposizione allo sviluppo di POF (Niederwieser et al., 2021).

Nelle donne con SM, altri studi hanno riportato un aumento incidenza di iperprolattinemia e di segni e sintomi di iperandrogenismo: aumento dei livelli di androstenedione, testosterone totale e libero, maggiore incidenza di pelle grassa, acne e irsutismo (Falaschi et al., 2001).

Questo modello endocrino è simile a quello osservato nella sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), frequente nelle donne fertili. La PCOS viene solitamente diagnosticata anche in base alla morfologia ecografica ovarica, ma ad oggi mancano ancora studi sulla morfologia ovarica nelle donne con SM. Nella PCOS si può osservare un certo grado di iperattivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e alcune prove indicano che questo asse endocrino potrebbe essere cronicamente attivato nella SM, in particolare nella forma Progressiva Primaria (SM-PP) (Then Bergh et al., 1999).

Meccanismi infiammatori, principalmente citochine pro-infiammatorie (come IL-1, IL-6 TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ), stimolano i neuroni secernenti l'ormone di rilascio della corticotropina (CRH) nei pazienti con SM, attivando così cronicamente le ghiandole surrenali. Al contrario, in forme più aggressive, in cui si trova un numero maggiore di lesioni demielinizzanti nell'ipotalamo, l'asse CRH-ACTH potrebbe essere inibito, con ridotta sintesi di cortisolo.

L'attivazione cronica della secrezione di CRH potrebbe rappresentare il legame tra SM e PCOS, contribuendo alla minore fertilità nelle donne con SM (Besedovsky et al., 1996).

Per quanto riguarda l'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, le donne con SM hanno mostrato livelli di ormone follicolo-stimolante (FSH) e di ormone luteinizzante (LH) significativamente più alti e livelli di estrogeni significativamente più bassi nella prima fase follicolare del ciclo mestruale (Huitinga et al., 2001), il che farebbe porre nuovamente ed ulteriormente il sospetto su una possibile riduzione del pool follicolare.

### 2.3 Gravidanza

La Gravidanza per le pazienti con Sclerosi Multipla è un momento di maggiore benessere, grazie allo shift immunologico che aumenta la tolleranza al self e permette di accogliere il prodotto del concepimento; di per sé non incide sullo stato della patologia, tuttavia nel post-partum c'è il rischio di riacutizzazione. L'aumento del rischio di ricaduta post-partum, può essere dovuto alla rimozione improvvisa dei fattori protettivi della gravidanza o a fattori deleteri unici inerenti al periodo post-partum stesso. Il miglior predittore per stabilire se una paziente avrà una ricaduta post-partum è la presenza di una forma di SM recidivante attiva nei mesi che precedono la gravidanza (Voskuhl et al., 2017).

Studi a breve termine, con 2 anni o meno di follow-up, non hanno mostrato alcun effetto netto di una singola gravidanza sul livello di disabilità. Tuttavia, studi a lungo termine che hanno seguito pazienti per molti anni hanno suggerito che le donne con multiple gravidanze hanno meno disabilità e/o impiegano più tempo per raggiungere un dato livello di disabilità. In una coorte di 2466 pazienti seguite fino a 10 anni, un numero maggiore di gravidanze era indipendentemente associato a punteggi di disabilità inferiori (D'hooghe et al., 2012). Non sono però, da escludere bias di selezione in base a cui le donne con SM meno disabilitante avevano maggiori probabilità di rimanere incinte più volte. Un altro potenziale effetto della gravidanza è che essere multipara, rispetto a nullipara, riduce la probabilità di una donna di sviluppare la SM; uno studio australiano su 282 pazienti con SM e 542 controlli ha rilevato che l'aumento del numero di gravidanze era associato a un minor rischio di sviluppare il primo evento demielinizzante (Ponsonby et al., 2012).

Questo ha permesso la distinzione tra l'effetto biologico della gravidanza sulla malattia rispetto al potenziale bias che la malattia può esercitare sulla decisione della paziente di diventare incinta. Questo studio ha indotto a ipotizzare che la tendenza delle donne negli ultimi decenni a ritardare la loro prima gravidanza e ad avere meno figli possa contribuire alla nota crescente incidenza della SM nelle femmine. Le donne con una storia familiare di SM dovrebbero essere rassicurate sul fatto che avere più gravidanze non avrà un impatto negativo sul rischio di sviluppare la SM. L'effetto che la malattia può esercitare sulla gravidanza è sia attraverso un impatto diretto sulla fertilità che indirettamente, attraverso farmaci che compromettono la qualità/quantità degli ovociti. Per alcuni di essi è consigliata una finestra di attesa di circa 6 mesi tra la sospensione della terapia e l'inizio della gravidanza.

Lo stato della patologia, fattori prognostici negativi, l'evoluzione in tempi brevi sono sicuramente condizioni che controindicano una gravidanza.

Dal punto di vista fetale, circa il 3% dei bambini nati in Nord America da madri con SM presenta un'anomalia congenita. L'esito della gravidanza è il risultato di una eredità multifattoriale che comprende fattori genetici (cromosomi, mutazioni di un singolo gene) per un 15-25%, fattori quali l'esposizione del feto a infezioni (es. Citomegalovirus, Varicella, Rosolia), tossine (es. alcol, cocaina) o condizioni mediche materne (diabete, epilessia, fenilchetonuria) che nel complesso rappresentano l'80%. È possibile che un ambiente intrauterino compromesso sia alla base dell'effetto materno osservato nella SM. Un'ipotesi è che un ambiente intrauterino anormale che porta a uno sviluppo fetale alterato potrebbe plausibilmente anche provocare una maggiore suscettibilità alla SM (Ramagopalan et al., 2010).

## 2.4 Effetto dei farmaci sulla fertilità, gravidanza e allattamento

Nonostante l'approvazione delle DMT nel trattamento della SM più di 20 anni fa, le informazioni sulla loro sicurezza relative a fertilità, gravidanza e allattamento al seno sono limitate. Le informazioni sulla sicurezza per l'attuale gamma di DMT approvate, si riferiscono principalmente alle categorie di rischio di gravidanza e allattamento della Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti.

Analizzando i rischi associati all'uso dei farmaci utilizzati nel trattamento della SM, è emerso che (vedi anche Tabella 1):

- i corticosteroidi mirati alla madre sono più benefici che dannosi per il feto. Prednisone e prednisolone sono inattivati dalla placenta in modo che l'esposizione fetale sia minima. Le attuali conoscenze sostengono l'opinione che i farmaci steroidei non abbiano alcun effetto teratogeno nell'uomo e non comportino alcun rischio di intossicazione fetale a dosi terapeutiche, pertanto sono indicati nel trattamento delle ricadute acute durante la gravidanza (Argyriou et al., 2008).
- La terapia con immunoglobuline per via endovenosa è approvata per la sua capacità di prevenire le ricadute acute durante la gravidanza e ha mostrato non avere effetti negativi sul feto.
- L' Interferone beta (IFN-β) non ha grosso impatto sulla fertilità per lo più si associa a irregolarità mestruali. Considerato di categoria "C" dalla Food And Drug Administration, non è teratogeno, tuttavia, studi su scimmie, hanno segnalato che l'esposizione durante il primo trimestre causa un effetto abortivo dose-dipendente, ritardo di crescita intrauterina e basso peso alla nascita.
- Il Glatiramer Acetato (categoria B della FDA), è un polipeptide sintetico con azione immunomodulante, che mima la regione immunogena della proteina basica della mielina. Non è causa di complicanze teratogene. La conoscenza dell'esposizione a GA deriva da un'analisi retrospettiva di 215 gravidanze incluse tra il 1996 e il 2002. Ci sono stati 5 singoli casi di anomalie congenite (anomalia delle dita, cisti surrenalica, cardiomiopatia, uretrotrostenosi, anencefalia). Il numero di nati vivi, aborti spontanei e interruzioni terapeutiche è in linea con la popolazione generale. Il GA non attraversa la barriera placentare ed è considerato probabilmente compatibile con l'allattamento al seno.
- Il Dimetil-Fumarato, è un'immunomodulante, antinfiammatorio, neuroprotettivo descritto per la prima volta nell'ambito della psoriasi ora approvato in somministrazione orale anche per la SMRR. In uno studio osservazionale su 15 pazienti affette da psoriasi durante la

gravidanza, non si è mostrato embriotossico o teratogeno, tuttavia è stato evidenziato un aborto spontaneo. Non è noto se il farmaco attraversi la placenta o sia secreto nel latte materno ma la sua somministrazione durante l'allattamento al seno non è raccomandata.

- Il Mitoxantrone (categoria C della FDA) è un antineoplastico sintetico che prende di mira la replicazione delle cellule immunitarie. Come inibitore del complesso topoisomerasi II-Hsp90 (proteina da shock termico 90), colpisce selettivamente tutte le cellule proliferanti, inibendo le cellule B più delle cellule T. Effetto collaterale importante è la cardiotoxicità, motivo per cui è richiesto il monitoraggio della funzione cardiaca. Può dare disfunzioni mestruali e influenzare la riserva ovarica, in quanto nelle donne sotto i 35 anni è stata segnalata un'amenorrea di lunga durata legata a una riduzione del pool follicolare. È un farmaco teratogeno, nei modelli preclinici esercita un impatto negativo sul feto, inclusi basso peso alla nascita, aumento dei tassi di parto prematuro e sviluppo anormale dei reni. Ha un passaggio placentare limitato, tuttavia è secreto nel latte e controindicato durante l'allattamento, motivo per cui le pazienti devono essere istruite all'uso di contraccettivi per non iniziare una gravidanza durante la sua assunzione e per almeno 6 mesi dopo l'interruzione.
- Il Natalizumab (categoria C della FDA), è un anticorpo monoclonale umanizzato ricombinante. Nella SM, le lesioni si sviluppano presumibilmente quando le cellule immunitarie attivate responsabili dell'infiammazione, compresi i linfociti T, attraversano la barriera emato-encefalica. Il Natalizumab previene la tras migrazione di queste cellule immunitarie attraverso la barriera ematoencefalica bloccando la subunità alfa-4 delle molecole di integrina che sono coinvolte nell'adesione e nella migrazione delle cellule dal sistema vascolare ai tessuti infiammati. Il principale problema di sicurezza associato all'uso del Natalizumab è l'aumento del rischio di leucemia promielocitica. Studi su animali mostrano una ridotta fertilità associata al farmaco. Anche l'epitelio uterino umano e il tessuto embrionale esprimono i recettori dell'integrina  $\alpha$ . Teoricamente, il Natalizumab potrebbe interferire con l'impianto e lo sviluppo dell'embrione inibendo le interazioni cellula-cellula, ma nessuno dei due eventi è stato ad oggi verificato. Le complicanze cardiovascolari sono possibili attraverso l'inibizione delle integrine  $\alpha$  coinvolte nello sviluppo dell'epicardio. Il Natalizumab attraversa la placenta nel secondo trimestre ed è secreto nel latte materno in piccole quantità. Sebbene sia improbabile che venga assorbito intatto attraverso la mucosa gastrointestinale, l'uso sicuro nelle madri che allattano non è stabilito.
- Il Fingolimod (categoria C della FDA), è un agonista della sfingosina-1-fosfato (S1P), si lega e attiva i recettori S1P. Impedisce ai linfociti di uscire dai linfonodi, riducendone così

il numero nel sangue periferico. Ciò si traduce in linfopenia entro poche ore dalla somministrazione.

Il trattamento con Fingolimod è associato a un aumentato rischio di bradiaritmia e blocchi atrioventricolari, test di funzionalità epatica elevati e un aumentato del rischio di infezioni, comprese infezioni virali da Herpes Simplex, criptococco e Varicella Zoster. Sono state segnalate anomalie congenite, compreso il tronco arterioso persistente. Questo risultato non è inaspettato dato che i recettori S1P sono coinvolti nello sviluppo vascolare durante l'embriogenesi. Il Fingolimod attraversa la placenta e viene secreto nel latte materno.

- La Cladribina (categoria D della FDA) è un farmaco antineoplastico del gruppo degli antimetaboliti purinici, indicata per il trattamento della leucemia e del linfoma a cellule capellute. Causa la soppressione delle cellule in rapida divisione, comprese le cellule testicolari. Negli animali, è teratogena in tutte le fasi dello sviluppo in utero, ma non c'è evidenza di teratogenicità nell'uomo. È stata segnalata una gravidanza riuscita in seguito alla somministrazione di Cladribina a una paziente con leucemia a cellule capellute. Non è noto se la Cladribina attraversi la placenta o sia secreta nel latte materno. Tuttavia, dato il suo peso molecolare (~ 286 kD), esiste tale possibilità (Cree et al., 2013).

In conclusione:

1. I farmaci attualmente utilizzati per la SM possono avere effetti negativi sulla fertilità, esercitando effetti negativi sui gameti, potrebbero colpire l'equilibrio ormonale, ridurre il numero di follicoli, interferire con il funzionamento delle ovaie, delle tube, dell'utero o della cervice.
2. Dato il meccanismo, ancora non ben definito, del passaggio dei farmaci nel latte materno, la maggior parte dei medici consiglia di sospendere la terapia durante l'allattamento al seno, nonostante non sia controindicato. Molte donne scelgono di riprendere la terapia immediatamente, omettendo così l'allattamento al seno per ridurre le possibilità di ricaduta, altre iniziano ad allattare per un periodo massimo di 3 o 4 mesi per fornire ai loro bambini gli ovvi benefici del latte materno.
3. La SM non è di per sé un motivo per evitare la gravidanza, al momento non ci sono prove di rischi significativi per il suo corso né per l'esito del parto, né tanto meno dell'influenza della gravidanza stessa sul corso generale a lungo termine della patologia, Durante la gravidanza il rischio di ricadute è basso soprattutto nel terzo trimestre; al contrario, è circa 2-3 volte più comune nei primi 6 mesi dopo il parto.

<b>EFFETTI DEI FARMACI</b>	<u>Interferone Beta</u>	<u>Glatiramer Acetato</u>	<u>Mitoxantrone</u>	<u>Natalizumab</u>
<b>Fertilità</b>	Irregolarità mestruali nelle scimmie  Nessuno studio ben controllato sull'uomo	No effetti avversi nei ratti  Nessuno studio ben controllato sull'uomo	No effetti avversi su ratti e conigli  Chemioterapico induce amenorrea negli umani	Aumento degli aborti nelle scimmie  Nessuno studio ben controllato sull'uomo
<b>Teratogenicità</b>	No malformazioni nelle scimmie	No malformazioni nei ratti e nei conigli	Ritardo di crescita nei ratti, no effetti teratogeni nei conigli	No effetti avversi nelle scimmie
<b>Passaggio trans-placentare</b>	improbabile	improbabile	Limitato	Si
<b>Secrezione nel latte materno</b>	Non riportato	Non riportato	Si	Si
<b>Allattamento</b>	Non raccomandato	Discutere del potenziale rischio con i parenti	Non raccomandato	Non raccomandato
<b>Tempi di attesa dalla sospensione del farmaco, al concepimento</b>	Non riportati	Non riportati	6 mesi	3 mesi
<b>Classe di Gravidanza FDA</b>	<b>C</b>	<b>B</b>	<b>D</b>	<b>C</b>

Tabella 1. Principi di sicurezza riproduttiva dei farmaci modificanti la malattia approvati nelle pazienti con Sclerosi Multipla (Cree et al., 2013).

## 2.5 Menopausa

Poiché la SM è una malattia progressiva che dura tutta la vita, la maggior parte delle pazienti affronta anche il post-menopausa. Sfortunatamente, le informazioni sul decorso della SM dopo la menopausa sono scarse e contrastanti, e frequenti possono essere le sovrapposizioni tra i sintomi menopausali e quella della SM.

Probabilmente i cambiamenti immunologici, neurodegenerativi ed endocrini come la deprivazione gonadica steroidea e quindi la perdita dell'effetto protettivo degli estrogeni, possono potenzialmente portare le donne anziane ad avere un peggioramento della SM, come si evince da un vecchio studio basato su un questionario che ha esaminato le donne in post-menopausa per valutare la gravità della malattia dopo la cessazione dei periodi mestruali

regolari (Smith et al., 1992). Il 54% delle donne intervistate che non erano in terapia ormonale sostitutiva (HRT) ha riportato un peggioramento di tutti i sintomi associati alla SM e, in effetti, alla disabilità neurologica. Il 75% delle donne sottoposte ad HRT ha riportato un miglioramento sintomatico e una disabilità stabile correlata alla SM. A causa della natura di alcune terapie citotossiche utilizzate nelle giovani donne con SM, la menopausa iatrogena è una seria preoccupazione. Uno studio retrospettivo ha analizzato 189 donne con un'età media di 35 anni all'inizio della terapia che sono state trattate con mitoxantrone per 15 mesi con una dose cumulativa mediana di 100 mg/m<sup>2</sup>, riportando un tasso di amenorrea permanente del 26% e stato di menopausa alla conclusione dello studio (Cocco et al., 2008). Più recentemente, è stato riportato che i punteggi di gravità della SM riportati dai pazienti sono stati significativamente aumentati nei pazienti con SM con menopausa precoce o iatrogena. Durante la menopausa, il rischio di malattie autoimmuni aumenta nelle donne. Le donne anziane mostrano una risposta pro-infiammatoria più forte a causa della senescenza del sistema immunitario che porta a un'infiammazione cronica di basso grado specifica per il sesso. Il calo della concentrazione di estrogeni durante la menopausa è correlato a un numero ridotto di cellule B e T e a una maggiore secrezione di citochine pro-infiammatorie (Maglione et al., 2019). Molte donne con SM possono iniziare a sviluppare sintomi progressivi, passando dalla categoria della malattia recidivante-remittente (SMRR) alla fase progressiva secondaria (SMPS). La terapia ormonale sostitutiva può aiutare a migliorare i sintomi primari correlati alla menopausa e ridurre il tasso di perdita ossea progressiva correlata all'esposizione agli steroidi e alle alterazioni ossee legate all'età (Houtchens et al., 2017).

## 2.6 Disfunzioni sessuali

L'effetto sulla funzione neurologica, inclusa la funzione sensoriale e automatica, da parte della patologia si traduce anche in termini di disturbi della sfera sessuale. Una revisione del 1995 del *North American Research Committee on Multiple Sclerosis* (NARCOMS) ha riportato una prevalenza di disfunzioni sessuali (SD) del 33-75% nelle donne. Secondo l'organizzazione mondiale della Sanità (OMS) la SD è una sindrome che include uno o più dei seguenti fattori: mancanza o perdita del desiderio sessuale, avversione sessuale e mancanza di godimento, fallimento della risposta genitale (secchezza vaginale o mancanza di lubrificazione), disfunzione orgasmica, eiaculazione precoce, vaginismo e dispaurenia. È stato proposto che la SM possa influenzare la funzione sessuale attraverso una varietà di meccanismi, sia diretti che indiretti, tuttavia l'esatta eziologia è ancora oggetto di dibattito (Friend et al., 2016). La disfunzione sessuale nella SM può manifestarsi a diversi livelli. La SD

primaria deriva da lesioni demielinizzanti che influenzano direttamente le vie neurali per le funzioni sessuali. Ad esempio, le lesioni del midollo spinale possono compromettere le sensazioni genitali, mentre le lesioni cerebrali possono influenzare la libido. Le donne con disfunzione sessuale primaria riferiscono una riduzione della libido (70-85%), orgasmo ritardato (76%), difficoltà a raggiungere l'orgasmo (fino al 70%), orgasmo meno piacevole (66%), lubrificazione ridotta (35-61%), anorgasmia (35-40%) e sensibilità genitale alterata (25-35%) (Delaney et al., 2017).

Anche senza influenzare questi percorsi neurali, le complicanze legate alla SM, come le disabilità fisiche, possono comunque interferire con il funzionamento sessuale, in altre parole, la SD secondaria. È stato scoperto che intestino e vescica neurogeni, scarso funzionamento cognitivo e affaticamento sono associati a disfunzione sessuale. La disfunzione cognitiva, in particolare è uno dei primi sintomi nei pazienti con SM ed è riconosciuto che contribuisce alla patogenesi della disfunzione sessuale. Il danno corticospinale e cerebellare, con conseguente debolezza, spasticità o coordinazione alterata, ma anche difficoltà di concentrazione, linguaggio confuso, difetti visivi possono influire sul desiderio dei pazienti di essere sessualmente intimi (Zhao et al., 2018).

Anche i farmaci prescritti per il trattamento sintomatico della Sclerosi Multipla, come il baclofene, gabapentin, amantidina, antidepressivi (antidepressivi triciclici, inibitori del re-uptake selettivo della serotonina - SSRI) possono avere un impatto negativo sulla componente sessuale. In uno studio su 47 donne con SM, la debolezza del pavimento pelvico (75%), la disfunzione intestinale (66%), e la disfunzione della vescica (89%) sono state correlate ad una lubrificazione ed orgasmo ridotti. La disfunzione del pavimento pelvico è comune nella SM, per l'importanza dell'interdipendenza di fattori meccanici, neurali, endocrini e ambientali nel suo sviluppo e dovrebbe essere ben riconosciuta dagli operatori sanitari. Mancano dati che indagano sulla reale prevalenza, incidenza, fattori di rischio specifici, risultati del trattamento e successive strategie di prevenzione per la donna con SM con sintomi multipli del pavimento pelvico e attualmente purtroppo resta una bassa priorità rispetto ad altri disturbi della patologia, con un trattamento subottimale (Hulter et al., 1995).

La SD terziaria, nasce dall'impatto psicologico emotivo e culturale della convivenza con la Sclerosi Multipla. La non autosufficienza, la necessità di assistenza continua, la mancanza di privacy esitano spesso in una perdita di autostima e preoccupazioni legate all'incapacità di riuscire a soddisfare il proprio partner. Non sono da sottovalutare anche le variabili demografiche tra cui età, numero di bambini, istruzione, stato civile e occupazione (Delaney et al., 2017). Le mestruazioni e l'uso di contraccettivi ormonali potrebbe anche svolgere un ruolo

nella risposta sessuale nelle donne con SM. Hulter e Lundberg hanno riferito che le mestruazioni potrebbero essere correlate con SD a causa dell'aumento della spasticità e del dolore (Hulter et al., 1995).

È interessante notare che il peggioramento ciclico o le frequenti ricadute dei sintomi preesistenti della patologia sono stati osservati spesso prima o all'inizio delle mestruazioni. Tale effetto potrebbe essere correlato ai cambiamenti ormonali. È stato anche ipotizzato che l'uso di contraccettivi ormonali influenzi l'insorgenza o il decorso della SM a causa degli aumenti dei livelli di estrogeni e progesterone (Zhao et al., 2018).

In conclusione la disfunzione sessuale è una manifestazione prevalente della malattia che influisce gravemente sulla qualità della vita. Può presentarsi anche senza una grave compromissione fisica o neurologica e nei pazienti giovani è devastante perché spesso perdono la capacità fisica di comunicare, abbracciare, stimolare, impegnarsi e mantenere le vie urinarie e intestinali continenti durante l'attività sessuale (Miletta et al., 2017).

## 2.7 Endometriosi

La SM è significativamente più frequente nelle donne con problemi pelvici di natura endometriosica (prevalenza 7 volte maggiore rispetto alla popolazione generale femminile nordamericana).

L'endometriosi è una malattia frequente caratterizzata da presenza di tessuto endometriale ectopico nell'addome, che spesso colpisce l'ovaio (endometrioma ovarico) provocando aderenze nel bacino, rottura dell'anatomia pelvica e compromissione della funzionalità della tuba. Sebbene benigna, l'endometriosi è una malattia cronica e ricorrente con sintomi che includono spesso dismenorrea (dolore con mestruazioni), dolore pelvico non mestruale e infertilità. Anche in precedenza e nelle fasi più lievi, l'endometriosi può influire negativamente sulla fertilità disturbando la biochimica intra-addominale e l'ambiente immunologico nel sito in cui la fecondazione ha luogo. Infine, la terapia chirurgica degli endometriomi ovarici (cistectomia laparoscopica) provoca inevitabilmente un certo grado di trauma ovarico, la perdita di parte del tessuto normale e una riduzione della riserva follicolare ovarica. I fattori immunologici, inclusi i meccanismi mediati dai linfociti e quelli mediati dagli anticorpi, sono certamente coinvolti nell'insorgenza dell'endometriosi; tuttavia, è attualmente sconosciuto se l'associazione osservata tra SM e l'endometriosi potrebbero essere dovute a meccanismi immunologici condivisi (Cavalla et al., 2006; Mormile and Vittori, 2014; Katiyar et al., 2018).

## 2.8 Infezioni Ginecologiche

La *Chlamydia trachomatis* è un patogeno batterico intracellulare obbligato che infetta la mucosa genitale e oculare degli esseri umani, causando infezioni che possono portare a malattie infiammatorie pelviche, infertilità e tracoma accecante. *C. pneumoniae* è un patogeno respiratorio che è la causa del 12-15% delle polmoniti acquisite in comunità. Si credeva che entrambe le specie di *Chlamydia* fossero limitate agli epitelii della mucosa genitale, oculare e respiratoria; tuttavia, prove crescenti suggeriscono che entrambi questi agenti patogeni possono essere isolati dal sangue periferico sia di individui sani che di pazienti con condizioni infiammatorie. La *Chlamydia* può anche essere isolata dai tessuti cerebrali di pazienti con disturbi neurologici degenerativi come la SM. Un numero crescente di studi *in vitro* suggerisce che alcune specie di *Chlamydia* possono infettare le cellule immunitarie, almeno a bassi livelli. Queste infezioni possono alterare la funzione delle cellule immunitarie in un modo che promuove la persistenza della *Chlamydia* nell'ospite e contribuisce alla progressione di diverse malattie infiammatorie croniche (Beagley et al., 2009).

Le infezioni a trasmissione sessuale (vedi *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*) sono ragioni comuni per cui le donne in età riproduttiva si presentano agli ambulatori ginecologici. Spesso dolore addominale e perdite vaginali aiutano nella diagnosi, altre volte fare la diagnosi corretta si rivela molto più difficile.

Infezioni vaginali e/o cervicale, infezioni o infezioni secondarie dal tratto gastrointestinale sono condizioni potenzialmente pericolose perché possono essere non diagnosticate o correttamente trattate in una malattia infiammatoria pelvica (PID); un'infezione acuta o cronica del tratto genitale superiore, che può portare a endometrite, salpingite, ooforite, periepatite, peritonite o ascesso tubo-ovarico. I pazienti di solito si presentano con febbre, condizioni generali ridotte e dolore.

## 2.9 Cancro

I pazienti con disturbi autoimmuni hanno rischio di cancro aumentato rispetto alla popolazione generale. La Sclerosi Multipla comporta un aumento del rischio di tumori maligni ematologici. Spesso i pazienti con malattia autoimmune hanno risposte immunitarie antivirali disregolate, anche contro i virus oncogeni.

Le infezioni virali hanno continuato ad avere la più forte influenza sul rischio di cancro nei pazienti con SM. Pertanto, possiamo concludere che una maggiore suscettibilità a infezioni virali più gravi contribuisce sostanzialmente al rischio di cancro complessivo.

È difficile distinguere se la malattia, gli effetti collaterali dei farmaci o gli effetti delle patologie autoimmuni sulle infezioni virali siano la causa sottostante dell'aumento del rischio di cancro nei pazienti con SM. La maggior parte dei farmaci nella SM sono farmaci immunosoppressori. La scoperta che i tumori associati alle infezioni virali sono aumentati in questi pazienti, suggerisce che i virus sono probabilmente importanti per la causa, anche se il rischio per quei virus è aumentato di conseguenza dai farmaci immunosoppressori. L'effetto immunomodulante e immunosoppressore dei DMT, ha aumentato anche il rischio di cancro al seno e melanoma. I contributi delle patologie autoimmuni e delle infezioni virali allo sviluppo del cancro sono specifici per il tipo di cancro. Questo studio mostra che i pazienti con SM hanno maggiori probabilità di essere diagnosticati con un'infezione da EBV clinicamente rilevante e anche i tumori ematologici sono associati a SM e stato di infezione da EBV. Pertanto, il rischio di tumori ematologici può essere dovuto all'infezione da EBV, che è associata al linfoma non Hodgkin, al linfoma di Burkitt e ad altre neoplasie delle cellule B. Con il successo dei programmi di screening precoce negli Stati Uniti, possiamo dire che il cancro del collo dell'utero è relativamente raro, così come gli altri tumori associati all'HPV. (Norgaard et al., 2019).

# CAPITOLO 3

## RISERVA OVARICA

Il Potenziale riproduttivo della donna è definito dalla riserva ovarica, cioè dal numero e dalla qualità degli ovociti in un dato momento.

Una donna nasce con circa due milioni di follicoli primordiali, ma all'inizio del menarca rimangono solo circa 400.000 follicoli a causa dell'atresia follicolare naturale. Quando una donna raggiunge circa i 35 anni, il ritmo di deplezione degli ovociti inizia ad aumentare e quando si avvicina ai 40 anni, il numero di follicoli diminuisce a circa 25.000, in concomitanza con un aumento significativo del tasso di aborto spontaneo.

La riserva ovarica è dipendente dall'età, dall'esposizione a fattori tossici, fumo, interventi chirurgici, e dal patrimonio follicolare individuale. Un qualsiasi declino della riserva ovarica può tradursi in minori chance di concepimento e in maggior rischio di menopausa precoce.

I marcatori di riserva ovarica comunemente usati servono come *proxy* per la quantità di ovociti ma sono considerati scarsi predittori della qualità ovocitaria. Pertanto, l'uso moderno del termine riguarda la quantità di ovociti rimanenti piuttosto che la qualità degli stessi, per i quali l'età rimane ancora il miglior predittore.

Con l'avvento delle tecnologie della riproduzione assistita (ART) negli anni '80, i test di riserva ovarica hanno iniziato ad emergere, con l'obiettivo di:

- ◇ rilevare il declino della riserva ovarica, la probabilità di gravidanza e tempi della menopausa in una fase sufficientemente precoce in modo da poter intraprendere protocolli di trattamento più ottimali e tempestivi possibili,
- ◇ pianificare strategie di consulenza e trattamento di giovani donne malate di cancro in procinto di sottoporsi a terapie gonadotossiche,
- ◇ contribuire a rendere più sicura l'induzione dell'ovulazione identificando e potenzialmente precludendo le persone a maggior rischio di sviluppare la sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS), una complicanza iatrogena pericolosa per la vita.

Lo screening prevede test biochimici basali e imaging ecografico delle ovaie:

- ◇ dosaggio di FSH, LH, 17- $\beta$ -estradiolo, Inibina B in 2°-3° giornata di ciclo mestruale,
- ◇ conta dei follicoli antrali (AFC),
- ◇ dosaggio AMH (ormone Anti-Mülleriano),
- ◇ Test di stimolazione con citrato di clomifene (CCCT),
- ◇ Misurazione del volume ovarico.

La maggior parte di queste misure, tuttavia, ha uno scarso valore predittivo, spesso perché sono misure indirette della riserva ovarica (ad es. FSH) o hanno un sostanziale variabilità intra/intermestruale. I "test dinamici" come il test di stimolazione con citrato di clomifene sono ancora in uso, molto probabilmente perché utilizzano vari protocolli di induzione dell'ovulazione. Tuttavia, Maheshwari et al., recentemente hanno suggerito l'abbandono dei test dinamici, principalmente a causa della mancanza di prove documentate di successo, e dell'urgente necessità di stabilire un consenso sulle prestazioni dei test, nonché di definire la normalità (Maheshwari et al., 2009).

### 3.1 FSH basale

La misurazione dei livelli sierici dell'FSH in fase follicolare precoce (2°-5° giorno dall' inizio del flusso mestruale) è una valutazione indiretta della riserva ovarica. Le donne con una normale riserva ovarica hanno una produzione sufficiente di ormoni ovarici che, tramite un meccanismo di feedback negativo, inibiscono in questa fase iniziale del ciclo mestruale la secrezione ipofisaria di FSH per mantenere i livelli entro il range normale. Al contrario, l'aumento dell'FSH in questa fase del ciclo mestruale indica una scarsa produzione di ormoni ovarici, causata da un ridotto pool follicolare ovarico.

Il test dell'FSH basale ha un limite importante: il rilascio pulsatile e circadiano di FSH nella circolazione. La variazione dei livelli basali mensili di FSH può anche verificarsi a causa della persistenza del corpo luteo accompagnato da livelli elevati di progesterone e bassi livelli di E2. Ragione per cui il test dell'FSH basale deve essere combinato con l'estradiolo, che aumenta la sensibilità del test del FSH follicolare precoce. La combinazione del FSH basale con l'estradiolo è più significativa poiché anche un FSH di intervallo normale può implicare una ridotta riserva ovarica nel contesto di estradiolo basale elevato. Nelle donne con una riserva ovarica in diminuzione, gli aumenti prematuri di FSH nella fase follicolare precoce determinano un aumento dei livelli di estradiolo, il che, a sua volta, può portare a un aumento del feedback negativo sulla produzione di FSH ipofisario mascherando così l'FSH anormale, elevazione che altrimenti rivelerebbe una diminuzione della riserva ovarica. Nonostante i suoi limiti, l'FSH è comunemente usato come test di riserva ovarica e valori elevati sono stati associati sia a una scarsa risposta ovarica che al mancato raggiungimento della gravidanza.

L'FSH ha una specificità particolarmente elevata (45-100%) per prevedere una scarsa risposta alla stimolazione ovarica (solitamente definita come  $\leq 4$  ovociti recuperati) utilizzando come cut-off un valore pari a 10 UI/L (10-20 UI/L), ma la sua sensibilità è generalmente scarsa (11-86%) (Domingues et al., 2010).

### 3.2 17-β-Estradiolo

Il 17-β-Estradiolo è un ormone steroideo prodotto dalle cellule della granulosa dei follicoli ovarici. I livelli di estradiolo sono comunemente valutati durante la prima fase follicolare del ciclo mestruale (2°-3° giorno di flusso mestruale) come parte del profilo ormonale del work-up del paziente, perché è uno strumento di screening semplice, economico ed efficace. Nonostante i progressi nella valutazione dell'estradiolo, una revisione sistematica dei test di riserva ovarica ha rilevato che i livelli basali di E2 avevano un basso valore predittivo per la valutazione della riserva ovarica. Tuttavia, livelli estremamente elevati di E2 (sopra 75 pg/ml) sono stati associati a bassi tassi di gravidanza. Pertanto, sebbene i livelli sierici di E2 possano non essere utili per la valutazione della riserva ovarica, possono aiutare a indicare se un'induzione dell'ovulazione debba essere annullata; per questo motivo dovrebbero essere inclusi nello screening femminile (Domingues et al., 2010).

### 3.3 Inibina B

L'inibina B è un ormone glicoproteico utile per valutare precocemente la riserva ovarica in diminuzione poiché è prodotta principalmente dalla coorte di follicoli antrali sensibile all'FSH. La riduzione della secrezione di inibina B, segno di una diminuzione delle dimensioni della coorte con l'aumentare dell'età, è associata a livelli più elevati di FSH e al declino della qualità degli ovociti e con una minore possibilità di una gravidanza di successo e nelle donne in età fertile le sue concentrazioni plasmatiche sono massime nella fase di transizione follicolo-luteale del ciclo, aumentando quattro giorni dopo il picco di FSH, implicando che l'FSH stimoli la produzione di inibina B. Le concentrazioni plasmatiche di inibina B diminuiscono nella fase follicolare tardiva, per aumentare nuovamente per un breve periodo il primo giorno post-ovulatorio.

Nella fase luteale le sue concentrazioni sono basse e il corpo luteo non secerne inibina B. Probabilmente, l'inibina B è un indicatore migliore dell'attività ovarica piuttosto che della riserva ovarica a causa della sua connessione diretta con il numero crescente di follicoli. Inoltre, è influenzata dal declino della funzione ovarica durante la fase avanzata dell'invecchiamento ovarico e del ciclo mestruale. Livelli sierici basali di inibina B inferiori a 45 pg/ml sono associati a scarsa risposta ovarica alle gonadotropine, alti tassi di cancellazione del ciclo di fecondazione in vitro, basso numero di ovociti recuperati e tassi di gravidanza ridotti. (La Marca et al., 2012).

### 3.4 Test di stimolazione con citrato di clomifene (CCCT)

Il CCCT prevede la misurazione del FSH sierico al terzo giorno di ciclo, prima del trattamento con citrato di clomifene (100 mg al giorno dal 5° al 9° giorno del ciclo), e al decimo giorno, dopo la sua somministrazione. Nelle donne con ovaie reattive, normalmente aumentano i livelli di inibina B ed estradiolo in seguito alla crescita dei follicoli ovarici, generando un feedback negativo sull'FSH che si riduce. Invece, nelle donne con DOR (Decreased Ovarian Reserve) si genera meno inibina B ed estradiolo con conseguente riduzione del feedback negativo; pertanto ci aspetteremo dei valori di FSH più elevati. Per tale motivo una concentrazione più elevata di FSH dopo la stimolazione con clomifene è indice di DOR. L'affidabilità del test risulta limitata, in quanto vi è una significativa variabilità inter-ciclo nella misurazione dei valori di FSH, inibina B ed estradiolo (Hannoun et al., 1998). Rispetto alla valutazione dei livelli basali di FSH, il livello di FSH del giorno 10 dopo stimolazione con citrato di clomifene non migliora l'accuratezza del test per la previsione della risposta ovarica alla stimolazione o della gravidanza dopo FIVET (Yanushpolsky et al., 2003).

### 3.5 Ormone Anti-Mülleriano (AMH)

L'ormone Anti-Mülleriano (AMH) è un membro della famiglia del fattore di crescita trasformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) che ha preso il nome dal suo ruolo durante la differenziazione sessuale maschile inducendo la regressione dei dotti mülleriani. Ad oggi, l'AMH è meglio conosciuto come marker sierico per la funzione ovarica, con valutazione dei livelli di AMH ad entrambe le estremità dello spettro, cioè riserva ovarica ridotta e sindrome dell'ovaio policistico. Nell'ovaio, l'AMH è espresso dalle cellule della granulosa dei follicoli in crescita dallo stadio primario fino all'antrale. Mentre i livelli di estrogeni e progesterone possono non diminuire fino al tardo periodo peri-menopausale o post-menopausale, l'ovaio inizia a produrre AMH in utero a circa 36 settimane di gestazione, i suoi livelli aumentano nelle giovani donne a partire dall'adolescenza e raggiungono il picco a circa 25 anni di età, quindi diminuiscono gradualmente fino a raggiungere livelli non rilevabili pochi anni prima della menopausa. L'AMH agisce come uno dei principali regolatori paracrini negativi della follicologenesi precoce poiché inibisce il reclutamento dei follicoli primari dal pool primordiale, impedisce la selezione dei follicoli da parte del FSH e inibisce l'aromatasi. Poiché l'AMH è espresso durante la normale follicologenesi precoce (secreto dai follicoli fino a 6 mm), è relativamente indipendente dalle gonadotropine circolanti a livelli fisiologici, a differenza di estrogeni e progesterone i livelli fluttuano solo in minima parte durante il ciclo ovulatorio. Pertanto, il

dosaggio non deve essere condizionato necessariamente dalla fase di ciclo mestruale, ma può essere eseguito in qualsiasi momento. I principali limiti del test AMH sono stati la variabilità del dosaggio e la mancanza di un dosaggio internazionale standardizzato. I valori di riferimento sono appropriati all'età con un'ampia variazione interindividuale, correlata anche alle metodiche di esecuzione e all'etnia che dovrebbe essere presa in considerazione nell'interpretazione dei valori di AMH. Sebbene i livelli massimi di AMH a 25 anni di età fossero più alti nelle donne cinesi rispetto alle donne europee, il declino correlato all'età nelle donne cinesi sembra maggiore, portando a livelli di AMH inferiori del 28% e dell'80% rispettivamente a 30 e 45 anni. Inoltre, le donne afro-americane sembrano avere livelli sierici di AMH più bassi rispetto alle donne bianche, ma un declino dipendente dall'età più lento. La mancanza di uno standard internazionale per l'AMH, anche 20 anni dopo lo sviluppo del primo test ELISA per l'AMH, è uno dei principali problemi che ostacolano il confronto del test per l'AMH. L'assenza di dosaggi calibrati in modo uniforme ha limitato lo sviluppo di valori soglia per l'AMH standardizzati, necessari per migliorare la sicurezza del paziente e per prevenire interpretazioni errate. Attualmente vengono attivamente utilizzate degli Stati Uniti, Europa e Asia, le piattaforme di dosaggio automatizzato AMH, che offrono un miglioramento di una maggiore precisione.

Come linea guida generale, consideriamo valori sierici di AMH appropriati all'età:

- 0.5 ng/ml per i 45 anni;
- 1 ng/ml per i 40 anni;
- 1.5 ng/ml per i 35 anni;
- 2.5 ng/ml per i 30 anni;
- 3.0 ng/ml per i 25 anni.

Nonostante il vantaggio del dosaggio dell'AMH risieda nell'essere indipendente da fattori come fase del ciclo mestruale, stile di vita come il fumo, BMI, altri potrebbero influenzarlo come:

- Il valore della vitamina D, i cui livelli mostrano variazioni stagionali con livelli più elevati in estate rispetto all'inverno. Dennis et al. hanno dimostrato che anche i livelli di AMH nelle donne in età riproduttiva mostrano questa variazione stagionale, con livelli inferiori del 18% in inverno che in estate. (Dennis et al., 2012).
- La PCOS (nelle donne più giovani, valori elevati di AMH possono inibire la sensibilità dei follicoli all'FSH e il successivo reclutamento follicolare).
- Soppressione ovarica correlata alla somministrazione di agonisti del GnRH (bassi livelli di AMH).

- Chemioterapia e la radioterapia possono entrambe avere effetti deleteri sulla funzione ovarica e di conseguenza sui livelli di AMH, con l'entità del danno dipendente dall'età del paziente, dal tipo di trattamento e dalla dose di trattamento.
- Contraccettivi ormonali (CO). La maggior parte delle donne in età riproduttiva usa un tipo di contraccettivo ormonale, ma gli effetti riportati dell'uso di CO sui livelli sierici di AMH sono contrastanti. Una revisione sistematica di Amer et al., analizzando 15 studi, ha concluso che i livelli sierici di AMH nelle donne normo-ovulatorie diminuivano quando i CO venivano usati per almeno un anno, e questo effetto era nella maggior parte degli studi reversibile dopo l'interruzione dell'uso di CO. Tuttavia, l'entità del declino variava dal 14% al 55%, il che potrebbe essere spiegato dalle differenze nel tipo di CO, durata dell'uso, tempi di misurazione dell'AMH durante il ciclo mestruale e metodiche di analisi dell'AMH utilizzate (Amer et al., 2020).

I livelli di AMH sono associati a cambiamenti legati all'invecchiamento nella risposta immunitaria. Le donne con malattie autoimmuni sono a rischio di menopausa precoce e quindi a maggior rischio di infertilità e malattie associate alla menopausa come l'osteoporosi e le malattie cardiovascolari (Moolhuijsen et al., 2020). Una recente meta-analisi di 19 studi che analizzavano pazienti con lupus eritematoso sistemico (LES) ha concluso che i livelli sierici di AMH erano significativamente più bassi nei pazienti con LES rispetto ai controlli sani (Luo et al., 2020). Le donne con artrite reumatoide (AR) di recente insorgenza avevano livelli di AMH comparabili a quelli dei controlli sani e l'uso di Metotrexate non influenzava i livelli di AMH. Tuttavia, Henes et al., hanno osservato livelli inferiori di AMH nelle donne con artrite reumatoide che cercavano di rimanere incinte. Gli autori hanno suggerito che la durata della malattia potrebbe spiegare questa differenza. In accordo, anche altri studi hanno riportato livelli di AMH 1.3 volte inferiori nelle donne con AR con una durata della malattia > 6 anni (Henes et al., 2015).

### 3.6 Conta dei follicoli antrali (AFC)

Il più grande vantaggio dei marker ecografici della riserva ovarica è la loro non invasività, facilità e rapidità di esecuzione. L'AFC è considerata un test accurato della riserva ovarica. Mostra un declino correlato all'età. Nonostante un numero relativamente limitato di studi, l'AFC è più efficace del volume ovarico per prevedere una scarsa risposta ovarica dopo l'induzione dell'ovulazione. Poiché l'AFC può essere eseguita durante gli esami follicolari precoci di routine, la sua inclusione come marker della riserva ovarica è consigliabile per tutte le donne

che considerano l'induzione dell'ovulazione per il miglioramento della fertilità, la fecondazione in vitro, la preservazione della fertilità e prima di sottoporsi a trattamenti oncologici.

La conta dei follicoli antrali (AFC) è la somma dei follicoli in entrambe le ovaie osservata all'ecografia nella prima fase follicolare (giorno 2°-4°) del ciclo mestruale. I follicoli antrali sono definiti come quelli che misurano 2-10 mm di diametro medio più grande sul piano bidimensionale (2D). Il conteggio dei follicoli antrali è facile da eseguire, fornisce un risultato immediato e ha una buona affidabilità inter-ciclo e inter-osservatore quando misurato in centri esperti, utilizzando un numero minimo di ecografi. Un'AFC di 3-4 follicoli (entrambe le ovaie combinate) è altamente specifica (73-97%) per prevedere una scarsa risposta ovarica (<3-4 ovociti, cancellazione del ciclo) ma ha una bassa sensibilità. In termini di previsione della non gravidanza, l'AFC è ancora specifica (64-98%) ma molto meno sensibile (7-34%). Esistono diverse limitazioni alla misurazione dell'AFC: deve essere eseguito all'inizio di un ciclo a causa della variazione intra-ciclo; è stata osservata una variazione significativa nell'AFC sia tra i centri che all'interno di essi, causata da differenze nella formazione degli operatori, numero di ecografi, metodologia e criteri per la misurazione dei follicoli antrali e differenze nella tecnologia degli ultrasuoni (ad es. risoluzione ecografica, 2D vs 3D ecc.). Inoltre, l'AFC ha la tendenza a sovrastimare il numero di follicoli e ovociti sensibili al FSH recuperati poiché inevitabilmente misura anche follicoli atresici della stessa dimensione. Inoltre, è stata osservata una maggiore variazione intra e inter-ciclo nelle donne in sovrappeso e obese, limitando il valore predittivo di AFC in questa sottopopolazione di donne che è in continuo aumento nei paesi industrializzati. In termini di previsione di OHSS, sia AFC che AMH, a differenza del FSH, dimostrano un forte valore predittivo per predire coloro a maggior rischio di OHSS (Tal et al., 2017).

### 3.7 Confronto tra AMH e AFC

Diversi studi di coorte e meta-analisi hanno dimostrato una correlazione positiva tra i due marcatori in quanto entrambi riflettono fisiologicamente il numero di piccoli follicoli antrali. (Hansen et al., 2011).

Un ampio corpo di prove ha dimostrato un valore clinico maggiore di AMH e AFC rispetto all'FSH. L'AMH diminuisce anni prima di un aumento del FSH e quindi è un biomarcatore in tempo reale più precoce e più sensibile della riserva ovarica. L'AMH ha una maggiore correlazione con il pool di follicoli primordiali rispetto ai marcatori ovarici prodotti dai follicoli durante la follicologenesi tardiva (inibina B ed estradiolo) e rispetto ai marcatori indiretti come

il FSH. In confronto, l'AFC misura solo i follicoli antrali che possono essere visualizzati mediante ecografia (Cil et al., 2009).

Vengono utilizzati in egual modo per predire sia una scarsa che un'eccessiva risposta ovarica, in quanto hanno un buon valore predittivo. Le misure composte che incorporano entrambi i metodi potrebbero potenzialmente essere utilizzate per fornire una valutazione completa della riserva ovarica, sebbene l'AMH abbia dimostrato di essere un migliore predittore della riserva ovarica in pazienti con risultati discordanti tra i due parametri.

La Tabella 2 descrive i principali vantaggi e svantaggi nell'utilizzo di AMH o AFC nella valutazione della riserva ovarica (Fleming et al., 2015).

Alcuni gruppi di ricerca hanno proposto sistemi integrati per la valutazione dell'età ovarica. In particolare, Venturella et al., hanno ideato un modello statistico avanzato in grado di identificare una modalità semplice e di facile intuizione per la definizione dell'età ovarica combinando dati clinici, biochimici e 3D-ultrasonografici (Venturella et al. 2015).

Le variabili biochimiche includono l'ormone follicolo-stimolante (FSH), l'estradiolo (E2), l'ormone Anti-Mülleriano (AMH), mentre le variabili ecografiche 3D sono la conta dei follicoli antrali (AFC), il volume ovarico, l'indice di flusso (FI) che rappresenta l'intensità media del flusso all'interno dell'ovaio, l'indice di vascolarizzazione (VI) che misura il numero di vasi sanguigni nell'ovaio, espresso come percentuale (%) del volume ovarico e indice di flusso/vascolarizzazione (VFI), ottenuto moltiplicando VI e FI (Venturella et al., 2015).

	AFC	AMH
Vantaggi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buon valore predittivo per il numero di ovociti recuperati e la risposta di stimolazione.</li> <li>• Può aiutare a guidare il protocollo e altre decisioni terapeutiche.</li> <li>• Facile da eseguire e personalizzare.</li> <li>• Abbastanza non invasivo.</li> <li>• Fornisce risultati immediati</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Buon valore predittivo per il numero di ovociti recuperati e la risposta di stimolazione.</li> <li>• Può aiutare a guidare il protocollo e altre decisioni terapeutiche</li> <li>• Ben caratterizzato nell'età adolescenziale e riproduttiva</li> <li>• Può essere eseguito in qualsiasi momento durante un ciclo</li> <li>• Buona coerenza tra i cicli</li> <li>• Buona coerenza tra operatori e centri</li> <li>• Costo relativamente basso (a seconda del dosaggio specifico dell'ormone Anti-Mülleriano)</li> </ul>
Svantaggi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deve essere eseguito all'inizio di un ciclo</li> <li>• Variazione tra centri a causa della determinazione soggettiva e delle differenze in tecnologia, formazione e metodologia.</li> <li>• Può essere sopravvalutato a causa dell'inclusione di follicoli atresici.</li> <li>• Inappropriato per molti individui giovani e adolescenti.</li> <li>• Maggiore variazione tra i cicli osservata nelle donne in sovrappeso e obese.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavoro intensivo, che richiede diverse ore.</li> <li>• Richiede un'attenta preparazione e conservazione del campione.</li> <li>• Nessuna standardizzazione tra i test.</li> <li>• Influenzato da CHT, RT, HC, PCOS, bassi livelli di Vit.D</li> </ul>

Tabella 2. Vantaggi e Svantaggi a confronto tra AFC e AMH.

### 3.8 Volume Ovarico

Il volume ovarico viene calcolato misurando ciascun ovaio su tre piani, utilizzando la formula per il volume di un ellissoide e si valuta il volume medio di entrambe le ovaie nello stesso individuo. Il volume ovarico è indice del numero di follicoli e degli ovociti che saranno recuperati. Un volume ovarico basso (< 3mm) o un diametro medio basso (< 2 cm) predice una scarsa risposta alla stimolazione ovarica con alta specificità e ampia sensibilità. La misurazione del volume ovarico ha un valore limitato per la rilevazione di DOR e quindi si preferisce ricorrere all'utilizzo della conta dei follicoli antrali (Esposito et al., 2002).

## CAPITOLO 4

### STRATEGIE DI PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ

La fertilità femminile ha ampia variabilità interindividuale; si osserva una lenta ma costante diminuzione della fertilità nelle donne di età compresa tra 30 e 35 anni, seguita da un declino accelerato tra le donne di età superiore ai 35 anni. Sebbene l'età cronologica sia il fattore predittivo più importante della risposta ovarica all'ormone follicolo-stimolante (FSH), il tasso di invecchiamento riproduttivo e la sensibilità ovarica alle gonadotropine varia considerevolmente da individuo a individuo. Entrambi i fattori ambientali e genetici contribuiscono all'esaurimento del pool di ovociti ovarici e alla riduzione della qualità degli ovociti (Alviggi et al., 2009).

La riserva ovarica è rappresentata principalmente da follicoli primitivi, che possono rimanere in tale stadio primordiale anche per oltre quarant'anni prima di evolversi in primari. La riduzione fisiologica del patrimonio follicolare avviene in primo luogo perché durante la vita riproduttiva è necessario un continuo reclutamento dei follicoli primordiali per favorire i processi di selezione che precedono l'ovulazione (Kelsey et al., 2011). Tali follicoli possono andare incontro ad atresia in tutte le fasi dello sviluppo. La quantità che viene attivata ad ogni ciclo rispecchia in maniera variabile il patrimonio totale di follicoli primari, con ampie differenze legate all'età.

Nelle donne la fertilità può essere compromessa da qualsiasi trattamento che riduca il numero dei follicoli primordiali, che impatti negativamente sull'equilibrio ormonale o che interferisca con il funzionamento delle ovaie, delle tube, dell'utero o della cervice. I trattamenti antineoplastici sono associati ad un elevato rischio di infertilità temporanea o permanente (AIOM, 2020), ed impattano in maniera significativa sulla riserva ovarica. Come essi, anche alcune terapie per patologie cronico-degenerative come la Sclerosi Multipla, potrebbero impattare sulla riserva ovarica, determinandone una sua riduzione, o avere effetto teratogeno.

La preservazione della fertilità rappresenta un tema di notevole rilevanza nei pazienti affetti da cancro (Loren AW et al., 2013) non soltanto in virtù del miglioramento della sopravvivenza dei tumori in età pediatrica e giovanile (Lee SJ et al., 2006; Schover LR et al., 2009; Peccatori FA et al., 2013), ma anche per il ritardo progressivo dell'età del primo concepimento (AIOM, 2020; Astolfi P et al., 2002).

In quest'ottica, s'inseriscono anche le pazienti affette da patologie cronico-degenerative, in particolare quelle che insorgono in età comprese tra i 20 e i 35 anni. Di questo gruppo, come detto precedentemente, fanno parte le pazienti affette da SM avendo una fertilità compromessa in relazione ai due aspetti fondamentali enunciati precedentemente: in primis la variabile tempo

in relazione all'età d'insorgenza e in secondo luogo la variabile legato all'utilizzo di farmaci gonadotossici. Proprio in relazione al primo aspetto, spesso ci confrontiamo con pazienti non ancora desiderose di prole, che non conoscono il proprio futuro in relazione all'evoluzione della malattia o alla necessità di terapie gonadotossiche, o anche eventuali quadri imprevedibili d'ingravesenza della patologia che potrebbero rendere impossibili eventuali terapie per una stimolazione ovarica controllata. Tutto questo ci fa capire come sia fondamentale e importante attribuire a pazienti con malattie cronico-degenerative la stessa rilevanza nell'ottica della preservazione della fertilità che è stata attribuita alle pazienti oncologiche.

#### 4.1 Le principali procedure di preservazione della fertilità

L'infertilità, come conseguenza di danno iatrogeno, ha determinato la necessità di offrire alla giovane paziente un corretto counseling multidisciplinare ma soprattutto riproduttivo per illustrare le migliori strategie disponibili per la preservazione dei gameti e la riduzione della tossicità gonadica. È fondamentale che il trattamento sia personalizzato in base alla paziente per garantire i migliori risultati possibili. I principali metodi per la preservazione della fertilità disponibili, standard e sperimentali, sono:

- Tecniche basate su PMA:
  - congelamento embrionario
  - congelamento ovocitario
  - congelamento ovociti immaturi
- congelamento tessuto ovarico

C'è da precisare, che attualmente non esistono linee guida specifiche per questo tipo di pazienti, nè tantomeno esistono trattamenti standardizzati. È in corso però una survey di esperti che sta mettendo appunto tali strategie, partendo da quelli che oggi sono i protocolli noti e collaudati usati per le pazienti oncologiche.

Tra le tecniche di crioconservazione, ad oggi, l'unica che abbia dimostrato risultati riproducibili, oltre alla crioconservazione degli embrioni, vietata in Italia dalla legge 40/2004, è quella della crioconservazione degli ovociti maturi. Tuttavia, tra le altre opzioni ancora considerate sperimentali, la crioconservazione di tessuto ovarico viene comunemente proposta come alternativa in quanto ha dato negli ultimi anni risultati abbastanza riproducibili nelle pazienti in cui non è stato possibile effettuare stimolazione ovarica. (AIOM, 2020).

La scelta dipende da diversi fattori: età e riserva ovarica della paziente, tipo di trattamento, diagnosi, presenza o meno di un partner.

#### *4.1.1 Crioconservazione degli ovociti maturi*

Dal gennaio 2013 la crioconservazione ovocitaria non è definita più una tecnica sperimentale, ma è stata dichiarata dall'ASRM (American Society Reproductive Medicine) una procedura standard (ASRM, 2013). In Italia è ormai proposta e discussa come metodica ottimale di preservazione della fertilità al momento del counseling a tutte le pazienti oncologiche che si apprestano a conservare la fertilità. Essa può rappresentare la scelta più appropriata anche in riferimento a quelle pazienti che non hanno un partner o che, per motivi etico-religiosi, rifiutano il congelamento degli embrioni.

La metodica prevede due fasi cliniche e una fase di laboratorio:

➤ La prima fase è quella della stimolazione che determina crescita follicolare multipla: la procedura prevede iniezione sottocutanea giornaliera di gonadotropine alla quale deve essere associata una seconda iniezione sottocutanea. Con quest'ultima viene somministrato l'antagonista del GnRH per prevenire il picco prematuro di LH e l'ovulazione spontanea precoce. La paziente che opta per tale tipo di procedura va sottoposta a monitoraggio della crescita follicolare ogni 2- 3 giorni mediante ecografia transvaginale. La durata della stimolazione può variare da 9 a 15 giorni e si devono associare dosaggi seriati di 17-β estradiolo. Il trattamento è estremamente personalizzato in quanto in base alla risposta individuale si può modificare il dosaggio delle gonadotropine. Il monitoraggio consente anche di stabilire il momento opportuno per indurre l'ovulazione e programmare il successivo prelievo eco-guidato degli ovociti (pick-up) che può avvenire dopo 36 ore. Sono previsti due tipi di protocolli. Quello standard prevede che la stimolazione cominci in corrispondenza della fase follicolare del ciclo mestruale, quindi nei giorni successivi dalla comparsa della mestruazione. Quando la paziente al momento del counseling non si trova nella fase adeguata del ciclo è possibile un "random start" ovvero l'inizio della stimolazione anche in fase luteale. Ovviamente come qualsiasi tipo di procedura può manifestare delle complicanze. In circa 1% dei cicli di riproduzione assistita si può verificare la sindrome da iperstimolazione ovarica. È una condizione temibile e da non sottovalutare in quanto può comportare eccessivo aumento del volume ovarico, versamento pelvi-peritoneale, emocoagulazione con possibile rischio trombotico, sofferenza epatica e renale, e necessita di ricovero e terapie intensive (Justice HM et al., 2008; Humaidan P et al., 2010). Per prevenire questi gravi effetti collaterali bisogna scegliere adeguatamente il dosaggio delle gonadotropine ed eventualmente indurre l'ovulazione con gli agonisti del GnRH al posto della gonadotropina corionica umana (hCG – Human chorionic gonadotropin) (Oktay K et al., 2010). In alcuni casi può essere necessario sospendere la stimolazione.

➤ La seconda fase prevede il prelievo di ovociti eco-guidato: la procedura è effettuata in day-surgery in anestesia generale o locale. Prevede l'introduzione di una sonda per via transvaginale alla cui estremità è montato un ago aspirante. Quest'ultimo, sempre sotto controllo ecografico, penetra attraverso la parete e arriva all'ovaio dove saranno aspirati gli ovociti. La durata è di circa 10 minuti. L'intervento è semplice con rarissime complicanze come emorragie e perforazioni di organi addominali.

➤ La fase di laboratorio prevede la valutazione, selezione e crioconservazione degli ovociti: in laboratorio i biologi selezionano gli ovociti in metafase II che vengono destinati o alla vitrificazione o allo slow freezing (congelamento lento).

Non tutti gli ovociti saranno utilizzabili dopo lo scongelamento e ciò dipende anche dalla tecnica usata per crioconservarli. Gli embrioni si caratterizzano per una migliore conservazione e possibilità di fertilizzazione rispetto agli ovociti in seguito allo scongelamento. La prima gravidanza con tecnica slow-freezing è stata ottenuta nel 1986, la vitrificazione è stata applicata dal 1999 e sta sostituendo il congelamento lento in quasi tutti i laboratori. Differenti studi comparativi hanno dimostrato la maggiore validità della vitrificazione rispetto al tradizionale congelamento lento (Chen SU et al., 2009; Smith GD et al., 2010; Cao XY et al., 2009; Paramanatham J et al., 2015).

I principali fattori che influenzano i risultati del congelamento ovocitario sono l'età della paziente al momento della procedura e il numero di ovociti crioconservati. La percentuale di bambini nati per scongelamento ovocitario varia dal 12.6% al 46.4% in relazione all'età delle pazienti e al numero di ovociti vitrificati (Rienzi L et al., 2012). Il tasso di malformazioni bambini nati in Italia da cicli di scongelamento ovocitario è sovrapponibile con quello della popolazione generale (Levi Setti PE et al., 2014).

# CAPITOLO 5

## SEZIONE SPERIMENTALE - RESEArch on ovarian reseRVE among

### Neurologic patients: the RESERVEN study

#### 5.1 Basi scientifiche

Negli ultimi decenni, la disponibilità di Terapie Modificanti la Malattia (DMT) ha ridotto il rischio di recidiva e la disabilità neurologica, consentendo alle giovani donne con SM di pianificare la propria vita genitoriale in modo simile alle donne non affette da SM. (Houtchens et al., 2018) Il ruolo protettivo della gravidanza sul decorso della SM è ben noto e le gravidanze dovrebbero essere sostenute, sebbene pianificate al fine di ridurre il rischio di relapse post-partum, nelle donne con SM. (Patas et al., 2013) Tuttavia, si sa poco su come le malattie autoimmuni incontrollate possano influenzare la fertilità. (Cavalla et al., 2006) In effetti, l'evidenza suggerisce che uno stato infiammatorio può danneggiare la riserva ovarica, dove si stima che le malattie autoimmuni siano la possibile causa in circa il 4-30% dei casi di insufficienza ovarica precoce (POI). (Szeliga et al., 2021) In realtà, l'ipotesi che l'infiammazione incontrollata influenzi negativamente la riserva ovarica, l'invecchiamento riproduttivo e la fertilità è stata rafforzata dall'osservazione di casi affetti da lupus eritematoso sistemico (LES). (Martins et al., 2017) Nel caso delle donne con SM, l'impatto della malattia sulla fertilità è ancora dibattuto. (Correale et al., 2012) In generale, la fertilità e il corso della gravidanza non sembrano essere influenzati dalla SM; tuttavia, le persone con SM possono posticipare il momento del concepimento, per paura di conseguenze per la prole, nonché per l'idea di soffrire di problemi fisici durante la gravidanza stessa o durante la maternità, limitando così l'uso dei dati epidemiologici sinora raccolti, per valutare il potenziale di fertilità. A questo proposito, una recente indagine italiana ha osservato che la diagnosi di SM rappresenta un enorme fattore condizionante il progetto di vita nel 7% degli intervistati, che ha deciso di non avere figli a causa della malattia; inoltre, i dati hanno suggerito che affrontare la SM ha avuto un impatto maggiore sull'aver il secondo figlio rispetto al primo. (Lavorgna et al., 2019) Un altro sondaggio recente ha mostrato che la malattia ha avuto un impatto significativo sui piani delle donne SM per avere figli nel 35% dei partecipanti. I motivi includevano: capacità di prendersi adeguatamente cura dei figli, il rischio che la SM peggiori (47%), il rischio di danni alla prole da parte dei farmaci per la SM (38%), il rischio di trasmettere la SM (31%). (Bonavita et al., 2021) Tuttavia, un recente studio danese ha dimostrato che le donne con SM avevano meno figli rispetto ai controlli sani. Sebbene non vi fosse alcuna differenza per quanto riguarda il numero di aborti elettivi, aborti spontanei o gravidanze ectopiche dopo l'esordio, il tasso di

fertilità totale (TFR) era inferiore nelle donne con SM rispetto ai controlli. (Moberg et al., 2020) La sempre crescente possibilità di pianificazione familiare per le donne affette da SM, grazie anche al sempre più diffuso uso di DMT, associata al riscontro che molte donne con SM fanno richiesta per PMA per poter ottenere una gravidanza, ha spinto la comunità scientifica a valutare anche la prognosi riproduttiva per tale categoria di pazienti.

Recentemente è stato osservato che le donne in età riproduttiva con SM recidivante-remittente (SMRR) sono caratterizzate da livelli sierici più bassi di ormone Anti-Mülleriano (AMH) (Sepúlveda et al., 2016; Thöne et al., 2015; Thöne et al., 2016), ma altri studi hanno mostrato risultati contrastanti. (Sadeghpour et al., 2020; Graves et al., 2018). In uno studio eseguito su donne in età fertile, i valori di AMH sono risultati inferiori nelle donne con SMRR, rispetto a quanto osservato nei controlli sani (Thone et al., 2016). Sono state poi ulteriormente suddivise le pazienti in base al valore di AMH in “AMH basso se  $< 0.8$  ng/ml” e “AMH molto basso se  $< 0.4$  ng/ml”, ed è stato osservato che quest’ultimo valore era presente in 11 pazienti con SMRR. Si è quindi notato che tali pazienti avevano uno stato di malattia più grave con una maggiore frequenza di episodi di relapse. Inoltre, è stato visto che le pazienti non in terapia mostravano valori ancor più bassi di AMH.

Çil et al., nel 2009, hanno valutato come, in pazienti in terapia immunomodulante, il volume ovarico e la conta dei follicoli antrali fossero ridotte rispetto ai controlli (Çil et al., 2009). Sepulveda et al, nel 2015, hanno per primi valutato entrambi i principali marcatori di riserva ovarica, AMH ed AFC, riscontrando che non c’è differenza tra soggetti malati e controlli sani, sebbene la riserva ovarica sia minore nei soggetti con maggiore attività di malattia (Sepulveda et al., 2015).

## 5.2 Obiettivi

Obiettivo principale di questo studio è quello di valutare la fertilità delle donne con sclerosi multipla attraverso l’analisi congiunta dei due principali markers di riserva ovarica, l’ormone Anti-Mülleriano e la conta dei follicoli antrali, e concentrandosi dunque sul fattore ovarico di infertilità, in un campione di donne italiane in età fertile, attraverso l’utilizzo di strategie diagnostiche automatizzate di ultima generazione, per una migliore riproducibilità del dato.

## 5.3 Materiali e metodi

Si tratta di uno studio monocentrico prospettico interventistico clinico-diagnostico caso-controllo, non farmacologico, no profit.

I casi sono donne in età riproduttiva, affette da patologia neurologica cronica come SM, reclutate presso gli ambulatori dedicati del DAI Testa-Collo (UOS Centro di Sclerosi Multipla) dell'Università Federico II di Napoli.

I controlli sono donne in età riproduttiva che hanno richiesto accesso ai percorsi di procreazione medicalmente assistita per infertilità da fattore maschile, reclutate presso il Centro di Sterilità del DAI Materno-Infantile dell'Università Federico II di Napoli. Per la selezione della popolazione di controllo sono stati utilizzati gli stessi criteri di inclusione ed esclusione, fatta eccezione per la diagnosi di patologia neurologica.

### **Criteri di Inclusione**

- Età 18-35
- BMI (Body Mass Index) 18-27 Kg/m<sup>2</sup>
- Diagnosi di SM
- Sottoscrizione del consenso informato per la partecipazione allo studio

### **Criteri di esclusione**

- Endometriosi (ASRM, 1997)
- PCOS (Criteri di Rotterdam, 2003)
- Per l'iperandrogenismo si considererà il Ferriman-Gallwey score
- BMI >27 Kg/m<sup>2</sup> e <18 Kg/m<sup>2</sup>
- Patologie genetiche e/o autoimmuni, note in anamnesi, con riconosciuto impatto sulla riserva follicolare (X fragile, Fibrosi cistica)
- Uso di contraccettivi
- Uso di farmaci psicoattivi
- Attività fisica agonistica

Tutte le pazienti che hanno avuto accesso agli ambulatori suddetti e che rispondevano ai criteri di inclusione ed esclusione sono state invitate a prendere parte allo studio, dopo aver firmato un appropriato consenso informato di partecipazione e trattamento anonimo dei dati personali. Le pazienti reclutate sono state poi sottoposte ad una dettagliata anamnesi e inserite nel protocollo di studio come segue: una volta reclutate nei rispettivi ambulatori, le pazienti caso sono state sottoposte a prelievo ematico per esami ematochimici di routine in regime di Day Hospital; tale prelievo è stato effettuato in fase follicolare precoce (dal 2° al 5° giorno del ciclo) al fine di poter utilizzare un'aliquota del campione prelevato per il dosaggio di ormone Anti-

Mülleriano (AMH), ormone follicolo-stimolante (FSH), estradiolo (E2), ormone luteinizzante (LH), e contestualmente, in occasione delle consulenze ginecologiche previste, è stata eseguita un'ecografia transvaginale (TV) per la conta dei follicoli antrali (AFC).

Le pazienti del gruppo di controllo, analogamente a quelle appartenenti al gruppo di studio, sono state sottoposte alle procedure e agli stessi prelievi sierici sopramenzionati. Si precisa come tali procedure siano effettuate routinariamente durante il percorso diagnostico di procreazione medicalmente assistita presso il centro di Sterilità del DAI Materno-Infantile dell'Università Federico II di Napoli.

- Dosaggi ormonali

Per il dosaggio di AMH, FSH, LH, ed E2, sono state utilizzate le metodiche (Immunoenzimatiche e/o in chemiluminescenza) attive presso il DAI di Medicina Interna, Immunologia Clinica, Malattie Infettive e Patologia Clinica.

- Valutazione ecografica trans-vaginale

Lo stesso giorno dei dosaggi ormonali, le pazienti sono state sottoposte ad ecografia TV effettuata da operatori qualificati. La valutazione dei parametri ultrasonografici è stata effettuata mediante tecnologie ecografiche all'avanguardia) con sonda transvaginale volumetrica (5-9 MHz). Nello specifico, l'acquisizione volumetrica di entrambe le ovaie è stata effettuata mediante l'elaborazione dei volumi con software dedicati. In particolare, i *dataset* ultrasonografici 3D acquisiti sono stati visualizzati sull'ecografo in visione multiplanare per cui ogni volume acquisito è stato elaborato e analizzato su ognuno dei tre piani. Si identifica, infatti, ogni follicolo e genera i seguenti parametri: volume, diametro follicolare medio  $d(V)$ , e i diametri X, Y, Z. L'immagine sul display viene ottimizzata in modo da generare un Volume di Interesse tridimensionale (VOI), ovvero un box al cui interno sia contenuto l'intero ovaio. Una volta che la VOI è accettata come corretta dall'operatore, si identificano i parametri volumetrici per ogni singolo follicolo. Ai fini dello studio, sono stati selezionati solo follicoli antrali tra i 2 e i 9 mm (Figura 1). Per la valutazione del volume ovarico e degli indici di vascolarizzazione è stato utilizzato il programma di imaging Virtual Organ Computer-aided AnaLysis (VOCAL imaging program; GE Medical Systems) come precedentemente descritto da altri autori. (Venturella et al., 2015; Deb et al. 2010). Durante l'analisi, è stata adoperata la modalità manuale della VOCAL Editor per tracciare il contorno dell'ovaio ed identificarne l'intero volume 3D con una rotazione di fase di 15°. Quindi sono stati analizzati un totale di 12 piani di taglio per ciascun ovaio fino a coprire 180°. L'"*histogram facility*" del programma VOCAL

ottiene automaticamente 3 indici di vascolarizzazione: il “Vascularization index” (VI) indica il numero dei “color voxels” presenti nel volume studiato, rappresentando in questo modo il numero di vasi che arrivano all’organo, ed è espresso come percentuale (%) del volume ovarico. Il “Flow Index” (FI) rappresenta l’intensità media del flusso all’interno dell’ovaio e l’indice di flusso/vascolarizzazione (VFI) è una combinazione di vascolarizzazione e di flusso (Figura 2).



Figura 1. Rappresentazione di conta dei follicoli antrali con ricostruzione 3D, in cui ad ogni follicolo viene assegnato un colore diverso a seconda del volume.

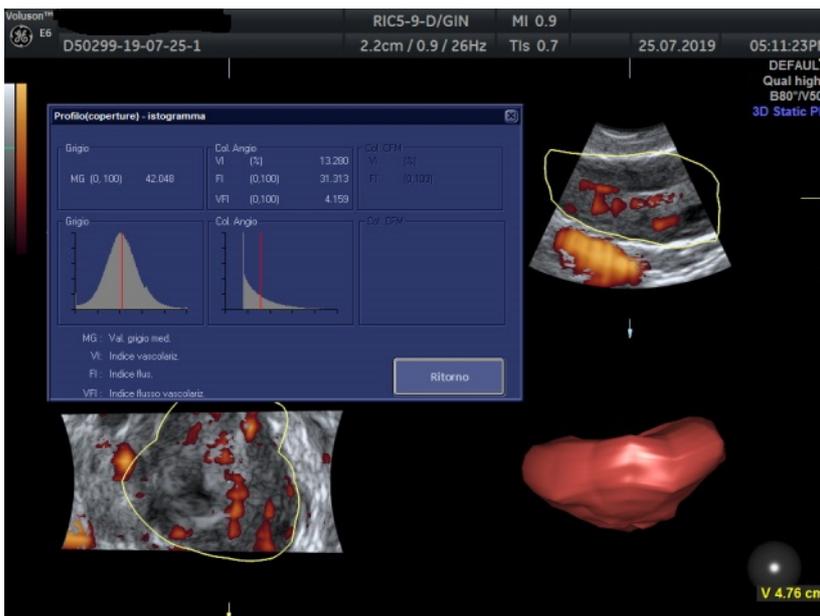


Figura 2. Rappresentazione di misurazione del volume con software VOCAL.

## 5.4 Analisi statistica

Tutti i calcoli statistici sono stati eseguiti utilizzando Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v. 19.0 (IBM Inc., Armonk, NY, USA). La distribuzione delle variabili continue è stata valutata mediante test di Shapiro o di Kolmogorov/Smirnov. Le variabili continue sono state descritte come medie e deviazione standard. Le variabili categoriche sono state descritte sotto forma di percentuali o come numero (percentuale). Variabili continue e categoriche tra i gruppi di studio sono state confrontate mediante test specifici (t-student, Anova, Mann-Withney, test  $\chi^2$ ). Una probabilità  $P < 0,05$  è stata considerata statisticamente significativa.

## 5.5 Risultati

25 pazienti affette da Sclerosi Multipla costituiscono il gruppo dei casi, mentre 43 pazienti, paragonabili per età e BMI, costituiscono il gruppo dei controlli. Le caratteristiche generali dei gruppi di studio sono descritte in Tabella 3.

I due gruppi sono paragonabili anche per le altre caratteristiche descritte, come l'abitudine al fumo e dati anamnestici di natura ginecologica. Non sussistono differenze statisticamente significative per quanto riguarda le caratteristiche generali tra i due gruppi di studio.

	<b>Casi (<i>n</i> = 25)</b>	<b>Controlli (<i>n</i> = 43)</b>	<b><i>P</i> value</b>
<b>Età (anni)</b>	30.53 ± 5.66	30.71 ± 1.3	NS
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.85 ± 3.88	24.16 ± 1.68	NS
<b>Fumo (si/no)</b>	4 (16)	6 (14)	NS
<b>Età al menarca (anni)</b>	12.21 ± 1.44	12.03 ± 1.07	NS
<b>Durata ciclo (giorni)</b>	29.05 ± 2.9	28.5 ± 1.99	NS
<b>Durata flusso (giorni)</b>	4.53 ± 1.12	4.86 ± 1.27	NS
<b>Parità (si/no)</b>	4 (24)	-	-

Tabella 3. Le caratteristiche generali del campione. I dati sono presentati come media ± deviazione standard o numero assoluto (percentuale).

Sia per quanto riguarda il dato strumentale proveniente dall'ecografia, sia per quanto riguarda il dato sierologico, non sono presenti differenze statisticamente significative tra i due gruppi in relazione ai markers di riserva ovarica analizzati (Tabella 4).

	<b>Casi (n = 25)</b>	<b>Controlli (n = 43)</b>	<b>P value</b>
<b>AMH (ng/mL)</b>	3.58 ± 3.21	3.22 ± 3.23	NS
<b>AFC (n)</b>	17.44 ± 5.92	12.95 ± 5.97	< 0.05
<b>FSH (mUI/mL)</b>	7.37 ± 1.08	7.025 ± 3.78	NS
<b>LH (mUI/mL)</b>	4.82 ± 1.51	5.01 ± 2.27	NS
<b>Estradiolo (pg/mL)</b>	46.27 ± 27.46	59.71 ± 32.47	NS
<b>TSH (UI/mL)</b>	1.74 ± 0.87	1.64 ± 0.71	NS
<b>Volume ovarico (mL)</b>	7.82 ± 3.49	6.51 ± 2.97	NS

Tabella 4. Markers di riserva ovarica nei casi e nei controlli. I dati sono presentati come media ± deviazione standard.

Senza voler entrare nel merito di quale parametro sia più rappresentativo della reale condizione di riserva ovarica, su cui da anni le società scientifiche e gli esperti si confrontano, sappiamo che esistono evidenze in letteratura di una maggiore variabilità tra differenti centri nella valutazione della conta dei follicoli antrali rispetto ad una minore variabilità relativamente alla valutazione dei parametri sierici (FSH, AMH). Prendendo inoltre in considerazione i risultati ottenuti dalle tecniche di procreazione medicalmente assistita effettuate sui controlli, si è andati a rivalutare la conta dei follicoli antrali modificando l'originario cut-off di 2 mm come parametro limite inferiore per l'identificazione degli stessi; portando infatti a 4 mm il limite inferiore di identificazione, si è visto che c'era maggiore corrispondenza tra la conta dei follicoli antrali e la risposta alla stimolazione ovarica, tenendo presente che si tratta di donne sane che accedono alla PMA per infertilità da fattore maschile. Si è dunque giunti alla conclusione che nonostante la standardizzazione dei criteri ecografici per la conta tridimensionale dei follicoli antrali già effettuata, sia necessaria una fase di post-processing per l'ottimizzazione del dato, poiché valori inferiori a 4 millimetri potrebbero essere segno di artefatti della ricostruzione ecografica dell'immagine, e non corrispondere a veri e propri follicoli attivi dal punto di vista ormonale e quindi funzionali. Il dato è stato dunque ricalcolato come segue (Tabella 5):

<b>AFC (n)</b>	12.14 ± 2.92	11.35 ± 3.74	NS
----------------	--------------	--------------	----

Tabella 5. Ricalcolo dei valori di conta dei follicoli antrali con cut-off minimo follicolare a 4 mm. I dati sono presentati come media ± deviazione standard.

In ultima analisi abbiamo valutato eventuali differenze all'interno del gruppo di studio in relazione alla durata di malattia ed alla terapia in atto. Il farmaco attualmente più prescritto nel gruppo di studio è il fingolimod, con il 40% dei casi, seguito dall'IFN-beta-1a con il 24%

(Tabella 6). 2 pazienti (8%) hanno chiesto sospensione del trattamento perché desiderose di prole, mentre 3 (12%) pazienti hanno spontaneamente ottenuto una gravidanza.

	<b>Casi (n = 25)</b>
<b>Durata di malattia (anni)</b>	2.1 ± 2.3
<b>Terapia in atto</b>	
• Fingolimod	10 (40)
• Dimetilfumarato	3 (12)
• IFN-beta-1a	6 (24)
• Natalizumab	4 (16)
• Nessuna	2 (8)

Tabella 6. Analisi di durata media di malattia e farmaci assunti dal gruppo dei casi.

I dati sono presentati come media ± deviazione standard o numero assoluto (percentuale).

## 5.6 Discussione

Non sono state registrate differenze statisticamente significative tra donne affette da SM e controlli sani per quanto riguarda i markers di riserva ovarica sia sierici, sia ultrasonografici dopo rivalutazione del dato in post-processing.

Ad ogni modo il dato indicativo e meritevole di approfondimento è che non solo la riserva ovarica sembra normale in donne affette da Sclerosi Multipla, per di più in terapia da un tempo medio di 2.1 anni, ma addirittura sembra di notare un trend verso una maggiore riserva ovarica rispetto ai controlli.

Questa affermazione va chiaramente contestualizzata in analogia alle limitazioni del nostro studio. In primis, trattandosi di uno studio prospettico, è uno studio ancora in corso e quindi il campionamento è attualmente ancora ridotto, anche per via delle difficoltà che la pandemia da SARS-COV-2 ha comportato.

L'eterogeneità del campione data dalla variabilità dei regimi terapeutici basati sulla DMT, e dalla diversa durata di malattia, oltre che l'esperienza del singolo operatore nell'esecuzione dell'AFC 3D rappresentano i principali punti deboli del presente studio. Al contrario, lo stesso cut-off e la stessa unità di misura per definire bassi livelli sierici di AMH, consente di definirne l'omogeneità dei dati.

La valutazione della fertilità nelle donne con SM è un argomento molto più complesso, con molti aspetti ancora da accertare. In primo luogo, in letteratura è stato dimostrato un legame tra auto-infiammazione e invecchiamento ovarico. (Schneider et al., 2021) L'invecchiamento

biologico è associato a cambiamenti significativi nel sistema immunitario, che potrebbero in parte mediare un'associazione dell'invecchiamento ovarico con il fenotipo della SM. Ci sono cambiamenti nelle popolazioni di cellule T con notevoli diminuzioni nelle cellule T-helper e CD4+ naïve, con relativi aumenti delle cellule CD4+ della memoria. (Graves et al., 2018) Allo stesso modo, è stato dimostrato che i pazienti con SMRR con attività patologica più elevata esprimevano segni di POI, suggerendo che l'attività infiammatoria della malattia può contribuire alla compromissione della riserva ovarica. (Sepulveda et al., 2016) Negli ultimi anni l'eziologia e la patogenesi della POI sono state ampiamente discusse. (Kirshenbaum et al., 2019) Inoltre, date varie ricerche che confermano che TNF- $\alpha$  e IL-6 possono svolgere un ruolo nella funzione ovarica, ne consegue che i fattori infiammatori possono essere una delle principali cause di POI. (Huang et al., 2019) Inoltre, è già stato osservato che uno stato pro-infiammatorio sistemico compromette la dinamica dello sviluppo follicolare. (Boots et al., 2015) È stata riscontrata una maggiore concentrazione di Proteina C Reattiva (PCR) nelle donne con tre onde follicolari rispetto alle donne con due onde follicolari, suggerendo che i livelli di PCR sistemica sono collegati a diversi modelli di reclutamento follicolare. (Clancy et al., 2013) Attualmente i dati sono scarsi per capire se l'alterazione, che porta ad una ridotta riserva ovarica, dipenda principalmente dall'esaurimento del pool dei follicoli primordiali, o dalla fase della follicologenesi FSH-dipendente. Inoltre, è stata dimostrata una ridotta proliferazione e una maggiore apoptosi delle cellule della granulosa in condizioni di ridotta riserva ovarica. (Zhao et al., 2022) Tuttavia, non è noto se nella SM l'eventuale danno ovarico riguarderebbe la teca o la granulosa, dato che finora non sono disponibili studi sull'istologia delle ovaie nelle donne affette da SM. Infatti, Thöne et al. (Thöne et al., 2016), non hanno trovato associazione tra anticorpi anti-ovarici o IL-1 $\alpha$ -1 $\beta$  e insufficienza/disfunzione ovarica. Ad ogni modo, l'associazione tra aborto spontaneo ricorrente e autoimmunità è ben nota, soprattutto in relazione all'immunità cellulare (Garrido-Gimenez et al., 2015; Bansal et al., 2011), che è anche implicata nella determinazione della SM.

Inoltre, i livelli basali di FSH, LH e prolattina sono stati trovati significativamente più alti nei pazienti con SM rispetto ai controlli ed è stata ipotizzata la possibilità di un abbassamento del tono dopaminergico, poiché la dopamina è un inibitore centrale della secrezione di prolattina e gonadotropine. (Grinsted et al., 1989) Ci sono però pochi studi che affrontano la relazione tra i cambiamenti del pattern endocrino e l'attività e il decorso della malattia della SM. (Coyle et al., 2021; et al., 2017) In effetti, i livelli di gonadotropine non sono sempre un buon predittore di riserva ovarica. (Cil et al., 2009)

Inoltre, uno studio recente ha mostrato che i tassi complessivi di natalità (LBR) nelle donne con

SM erano significativamente inferiori rispetto alle donne senza SM. La differenza tra i gruppi con e senza SM era più pronunciata nella fascia di età da 18 a 30 anni, in cui la SMRR (il decorso più comune della SM) era inizialmente diagnosticata nella maggior parte delle giovani donne, e da 31 a 34 anni, in cui la riserva ovarica ha dimostrato di iniziare a ridursi fisiologicamente. (Alviggi et al., 2009; Houtchens et al., 2020) Di conseguenza, è di fondamentale importanza valutare la riserva ovarica nelle donne affette da SM prima che l'attività della malattia diventi più grave, dato il relativo possibile rischio di riduzione del pool follicolare e quindi uno stato di ridotta fertilità.

È interessante notare che Thöne et al. (Thöne et al., 2015) hanno mostrato non solo che le donne con SMRR avevano livelli di AMH più bassi rispetto ai controlli, ma anche che le donne che assumevano farmaci per la SM presentavano valori di AMH diversi a seconda delle loro diverse terapie. Invece, Sepulveda et al. (Sepulveda et al., 2016) hanno osservato una diversa riserva ovarica tra le donne con SM in relazione al tasso annualizzato di recidiva, con una correlazione inversa tra l'attività della malattia e AMH, AFC e volume ovarico.

Sono necessari studi futuri per valutare l'impatto della malattia stessa sui marcatori di riserva ovarica, che prendano in considerazione le pazienti naïve, per ridurre ulteriormente i possibili effetti confondenti dei farmaci per la SM, e per comprendere definitivamente la relazione tra disfunzione ovarica e attività della malattia.

Inoltre, gli studi futuri dovrebbero essere progettati tenendo conto del trattamento delle donne, al fine di comprendere anche il ruolo dei singoli DMT nella disfunzione ovarica eliminando il bias di selezione dovuto all'eterogeneità dei farmaci tra le pazienti arruolate, come riscontrato negli studi condotto fino ad ora. Oltre alle indagini cliniche, anche gli studi di scienze di base dovrebbero essere incentrati sulla comprensione dei meccanismi molecolari e sulla descrizione delle caratteristiche istologiche associate alla compromissione ovarica nella SM.

Un'altra criticità da indagare in futuro è la reversibilità del danno ovarico, in relazione ai meccanismi causali appena citati (pool primordiale o pool FSH-dipendente, coinvolgimento della teca o della granulosa, pazienti naïve o condizione farmaco-dipendente, relazione con la attività di malattia); a questo scopo sono fortemente necessari studi multicentrici più ampi con follow-up più lunghi.

Detto questo, è importante fornire alle donne con SM una consulenza multidisciplinare per la pianificazione familiare, coinvolgendo esperti di medicina riproduttiva e neurologi per valutare la fertilità. Il *time to pregnancy* per queste pazienti dovrebbe essere adeguatamente tenuto in considerazione, come prerequisito per l'individualizzazione della scelta del trattamento in relazione al desiderio di gravidanza. Inoltre, è importante sottolineare che nelle donne con SM

con riserva ovarica ridotta (a causa della loro età avanzata o per SM), i programmi di tecnologia di riproduzione assistita (ART) non sono controindicati. Tuttavia, il protocollo di stimolazione più sicuro dovrebbe essere scelto con l'obiettivo di ridurre il rischio di recidive. (Hellwig et al., 2009) Nel nostro gruppo di studio 2 pazienti hanno richiesto l'interruzione del trattamento per desiderio di prole. Si configura qui la necessità di un approccio multidisciplinare che coinvolga il neurologo ed il ginecologo esperto di medicina della riproduzione per una valutazione accurata e rapida della fertilità della coppia, laddove il periodo libero da terapia può determinare un aumento delle ricadute ed un peggioramento del quadro clinico. D'altra parte le evidenze scientifiche mostrano che durante la gravidanza le alterazioni ormonali ad essa connesse riducono lo stato di attività della malattia raggiungendo il minimo nel terzo trimestre, ma aumentando bruscamente dopo il parto, in misura proporzionale allo stato di malattia precedente la gravidanza.

Fatte queste considerazioni appare quanto mai chiara l'importanza di ridurre il "time to pregnancy" in questa specifica categoria di pazienti e di conseguenza la necessità di conoscere attentamente la relazione tra la malattia, le sue terapie e la riserva ovarica.

In questo scenario si inserisce l'idea di una Survey multidisciplinare che coinvolge esperti di Medicina della Riproduzione e neurologi per provare a fornire delle raccomandazioni sulla gestione delle donne affette da Sclerosi Multipla in relazione al "time to pregnancy" e al progetto di pianificazione familiare. In particolare, questo progetto condotto dal Professor Alviggi, mette al centro la valutazione della fertilità e soprattutto le strategie terapeutiche e di management da attuare in caso di infertilità o soltanto in un'ottica di un corretto counselling, data la condizione di patologia cronico-degenerativa con impatto sulla qualità di vita, o in relazione ai trattamenti farmacologici che possono avere un impatto gonadotossico o teratogeno. La preservazione della fertilità rappresenta un'opzione valida anche per pazienti con SM laddove il progetto di pianificazione familiare sia ritenuto ancora lontano, si prospetti un percorso clinico e terapeutico lungo e debilitante oppure nei casi in cui alla diagnosi sia presente già una scarsa riserva ovarica.

## 5.7 Conclusioni

Non sono state rilevate differenze tra paziente affette da Sclerosi Multipla e controlli sani per quanto riguarda i principali marcatori di riserva ovarica e pertanto non sembra che l'eventuale impatto della Sclerosi Multipla sulla fertilità femminile è imputabile ad un'alterazione sia ormonale, a carico degli assi ormonali responsabili della regolazione dell'attività ovarica, sia costituzionale, a carico della riserva ovarica vera e propria. Allo stato attuale i risultati sono da

considerarsi solo come dati preliminari, non avendo ancora raggiunto la numerosità campionaria giudicata sufficiente ad ottenere una valutazione significativa. Le informazioni ottenute riguardo l'ottimizzazione del dato ecografico 3D sono da confermare e rivalutare su campioni più ampi.

## BIBLIOGRAFIA

- AIOM. (2018). Linee guida per la preservazione della fertilità nei pazienti oncologici. Available at: [https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2018/11/2018\\_LG\\_AIOM\\_PreservFertil.pdf](https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2018/11/2018_LG_AIOM_PreservFertil.pdf)
- Alviggi C, Humaidan P, Howles CM, Tredway D, Hillier SG. Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 Sep 22;7:101. doi: 10.1186/1477-7827-7-101.
- Amato MP, Bertolotto A, Brunelli R, Cavalla P, Goretti B, Marrosu MG, Patti F, Pozzilli C, Provinciali L, Rizzo N, Strobelt N, Tedeschi G, Trojano M, Comi G. Management of pregnancy-related issues in multiple sclerosis patients: the need for an interdisciplinary approach. *Neurol Sci*. 2017 Oct;38(10):1849-1858. doi: 10.1007/s10072-017-3081-8. Epub 2017 Aug 2. Erratum in: *Neurol Sci*. 2017 Dec 26;: PMID: 28770366.
- Amer SAKS, James C, Al-Hussaini TK, Mohamed AA. Assessment of Circulating Anti-Müllerian Hormone in Women Using Hormonal Contraception: A Systematic Review. *J Womens Health (Larchmt)*. 2020 Jan;29(1):100-110. doi: 10.1089/jwh.2019.7733.
- Argyriou AA, Makris N. Multiple sclerosis and reproductive risks in women. *Reprod Sci*. 2008 Oct;15(8):755-64. doi: 10.1177/1933719108324138.
- Astolfi P, Zonta LA. Delayed maternity and risk at delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2002 Jan;16(1):67-72. doi: 10.1046/j.1365-3016.2002.00375.x.
- Bansal AS, Bajardeen B, Shehata H, Thum MY. Recurrent miscarriage and autoimmunity. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011 Jan;7(1):37-44. doi: 10.1586/eci.10.84.
- Barone P, Brunetti A, Cappabianca P, Filla A, Gangemi M, Maiuri F, Santoro L, Spaziante R. *Sistema nervoso*, Idelson Gnocchi Editore, 2015.
- Beagley KW, Huston WM, Hansbro PM, Timms P. Chlamydial infection of immune cells: altered function and implications for disease. *Crit Rev Immunol*. 2009;29(4):275-305. doi: 10.1615/critrevimmunol.v29.i4.10.

Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol*. 2015 Mar;14(3):263-73. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70267-4.

Berger T. Biomarkers in the evolution of multiple sclerosis. *Neurodegener Dis Manag*. 2017 Nov;7(6s):3-6. doi: 10.2217/nmt-2017-0033.

Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 1996 Feb;17(1):64-102. doi: 10.1210/edrv-17-1-64.

Bonavita S, Lavorgna L, Worton H, Russell S, Jack D. Family Planning Decision Making in People With Multiple Sclerosis. *Front Neurol*. 2021 Apr 28;12:620772. doi: 10.3389/fneur.2021.620772.

Boots CE, Jungheim ES. Inflammation and Human Ovarian Follicular Dynamics. *Semin Reprod Med*. 2015 Jul;33(4):270-5. doi: 10.1055/s-0035-1554928.

Bove R, Elson L, Alvarez E, Borisow N, Cortez MM, Mateen FJ, Mealy MA, Mutch K, Topyne S, Ruprecht K, Buckle G, Levy M, Wingerchuk DM, Paul F, Cross AH, Weinshenker B, Jacob A, Klawiter EC, Chitnis T. Female hormonal exposures and neuromyelitis optica symptom onset in a multicenter study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2017 Mar 24;4(3):e339. doi: 10.1212/NXI.0000000000000339.

Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril*. 2009 Oct;92(4):1306-1311. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.08.069.

Cavalla P, Rovei V, Masera S, Vercellino M, Massobrio M, Mutani R, Revelli A. Fertility in patients with multiple sclerosis: current knowledge and future perspectives. *Neurol Sci*. 2006 Sep;27(4):231-9. doi: 10.1007/s10072-006-0676-x.

Chen SU, Yang YS. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2009 Mar;48(1):15-22. doi: 10.1016/S1028-4559(09)60030-9.

Cil AP, Leventoğlu A, Sönmezer M, Soyukoç R, Oktay K. Assessment of ovarian reserve and Doppler characteristics in patients with multiple sclerosis using immunomodulating drugs. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2009 Dec 1;10(4):213-9.

Clancy KB, Baerwald AR, Pierson RA. Systemic inflammation is associated with ovarian follicular dynamics during the human menstrual cycle. *PLoS One.* 2013; 8:e64807.

Cocco E, Sardu C, Gallo P, Capra R, Amato MP, Trojano M, Uccelli A, Marrosu MG; FEMIMS Group. Frequency and risk factors of mitoxantrone-induced amenorrhea in multiple sclerosis: the FEMIMS study. *Mult Scler.* 2008 Nov;14(9):1225-33. doi: 10.1177/1352458508094882.

Correale J, Farez MF, Ysraelit MC. Increase in multiple sclerosis activity after assisted reproduction technology. *Ann Neurol.* 2012 Nov;72(5):682-94. doi: 10.1002/ana.23745.

Costello FE, Burton JM. Multiple Sclerosis: Eyes on the Future. *J Neuroophthalmol.* 2018 Mar;38(1):81-84. doi: 10.1097/WNO.0000000000000631.

Coyle PK. What Can We Learn from Sex Differences in MS? *J Pers Med.* 2021 Oct 7;11(10):1006. doi: 10.3390/jpm11101006.

Cree BA. Update on reproductive safety of current and emerging disease-modifying therapies for multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013 Jun;19(7):835-43. doi: 10.1177/1352458512471880.

D'hooghe MB, Haentjens P, Nagels G, D'Hooghe T, De Keyser J. Menarche, oral contraceptives, pregnancy and progression of disability in relapsing onset and progressive onset multiple sclerosis. *J Neurol.* 2012 May;259(5):855-61. doi: 10.1007/s00415-011-6267-7.

Deb S, Campbell BK, Clewes JS, Raine-Fenning NJ. Quantitative analysis of antral follicle number and size: a comparison of two-dimensional and automated three-dimensional ultrasound techniques. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010;35:354–60.

Delaney KE, Donovan J. Multiple sclerosis and sexual dysfunction: A need for further education and interdisciplinary care. *NeuroRehabilitation.* 2017;41(2):317-329. doi: 10.3233/NRE-172200.

Dennis NA, Houghton LA, Jones GT, van Rij AM, Morgan K, McLennan IS. The level of serum anti-Müllerian hormone correlates with vitamin D status in men and women but not in boys. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jul;97(7):2450-5. doi: 10.1210/jc.2012-1213.

Domingues TS, Rocha AM, Serafini PC. Tests for ovarian reserve: reliability and utility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2010 Aug;22(4):271-6. doi: 10.1097/GCO.0b013e32833b4f5c.

Esposito MA, Coutifaris C, Barnhart KT. A moderately elevated day 3 FSH concentration has limited predictive value, especially in younger women. *Hum Reprod*. 2002 Jan;17(1):118-23. doi: 10.1093/humrep/17.1.118.

Falaschi P, Martocchia A, Proietti A, D'Urso R, Antonini G. High incidence of hyperandrogenism-related clinical signs in patients with multiple sclerosis. *Neuro Endocrinol Lett*. 2001 Aug;22(4):248-50.

Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, Ruman J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reprod Biomed Online*. 2015 Oct;31(4):486-96. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.06.015.

Friend S, Richman S, Bloomgren G, Cristiano LM, Wenten M. Evaluation of pregnancy outcomes from the Tysabri® (natalizumab) pregnancy exposure registry: a global, observational, follow-up study. *BMC Neurol*. 2016 Aug 24;16(1):150. doi: 10.1186/s12883-016-0674-4.

Garrido-Gimenez C, Alijotas-Reig J. Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management. *Postgrad Med J*. 2015 Mar;91(1073):151-62. doi: 10.1136/postgradmedj-2014-132672.

Ghezzi A, Zaffaroni M. Female-specific issues in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2008 Jun;8(6):969-77. doi: 10.1586/14737175.8.6.969.

Graves JS, Henry RG, Cree BAC, Lambert-Messerlian G, Greenblatt RM, Waubant E, Cedars MI, Zhu A; University of California, San Francisco MS-EPIC Team, Bacchetti P, Hauser SL, Oksenberg JR. Ovarian aging is associated with gray matter volume and disability in women with MS. *Neurology*. 2018 Jan 16;90(3):e254-e260. doi: 10.1212/WNL.0000000000004843. Epub 2017 Dec 22.

Grinsted L, Heltberg A, Hagen C, Djursing H. Serum sex hormone and gonadotropin concentrations in premenopausal women with multiple sclerosis. *J Intern Med*. 1989; 226: 241-4.

Hannoun A, Abu Musa A, Awwad J, Kaspar H, Khalil A. Clomiphene citrate challenge test: cycle to cycle variability of cycle day 10 follicle stimulating hormone level. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 1998;25(4):155-6.

Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril*. 2011 Jan;95(1):170-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.006.

Hart FM, Bainbridge J. Current and emerging treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care*. 2016 Jun;22(6 Suppl):s159-70.

Hellwig K, Schimrigk S, Beste C, Muller T, Gold R. Increase in relapse rate during assisted reproduction technique in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol*. 2009;61(2):65-8. doi: 10.1159/000177937. Epub 2008 Nov 28.

Henes M, Froeschlin J, Taran FA, Brucker S, Rall KK, Xenitidis T, Igney-Oertel A, Lawrenz B, Henes JC. Ovarian reserve alterations in premenopausal women with chronic inflammatory rheumatic diseases: impact of rheumatoid arthritis, Behçet's disease and spondyloarthritis on anti-Müllerian hormone levels. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Sep;54(9):1709-12. doi: 10.1093/rheumatology/kev124.

Houtchens MK, Edwards NC, Hayward B, Mahony MC, Phillips AL. Live birth rates, infertility diagnosis, and infertility treatment in women with and without multiple sclerosis: Data from an administrative claims database. *Mult Scler Relat Disord*. 2020 Nov;46:102541. doi: 10.1016/j.msard.2020.102541. Epub 2020 Sep 28.

Houtchens MK, Edwards NC, Schneider G, Stern K, Phillips AL. Pregnancy rates and outcomes in women with and without MS in the United States. *Neurology*. 2018 Oct 23;91(17):e1559-e1569. doi: 10.1212/WNL.0000000000006384.

Houtchens MK, Kaplan TB. Reproductive Issues in MS. *Semin Neurol*. 2017 Dec;37(6):632-642. doi: 10.1055/s-0037-1608925.

Huang Y, Hu C, Ye H, Luo R, Fu X, Li X, Huang J, Chen W, Zheng Y. Inflamm-Aging: A New Mechanism Affecting Premature Ovarian Insufficiency. *J Immunol Res*. 2019 Jan 2;2019:8069898. doi: 10.1155/2019/8069898.

Huitinga I, De Groot CJ, Van der Valk P, Kamphorst W, Tilders FJ, Swaab DF. Hypothalamic lesions in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001 Dec;60(12):1208-18. doi: 10.1093/jnen/60.12.1208.

Hulter BM, Lundberg PO. Sexual function in women with advanced multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995 Jul;59(1):83-6. doi: 10.1136/jnnp.59.1.83.

Humaidan P, Quartarolo J, Papanikolaou EG. Preventing ovarian hyperstimulation syndrome: guidance for the clinician. *Fertil Steril*. 2010 Jul;94(2):389-400. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.03.028.

Justice HM, Counselman FL. Ovarian hyperstimulation syndrome: an important complication of in vitro fertilization. *Am J Emerg Med*. 2008 Jan;26(1):115.e3-4. doi: 10.1016/j.ajem.2007.06.031.

Katiyar A, Sharma S, Singh TP, Kaur P. Identification of Shared Molecular Signatures Indicate the Susceptibility of Endometriosis to Multiple Sclerosis. *Front Genet*. 2018 Feb 16;9:42. doi: 10.3389/fgene.2018.00042.

Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WH. A validated model of serum anti-müllerian hormone from conception to menopause. *PLoS One*. 2011;6(7):e22024. doi: 10.1371/journal.pone.0022024.

Kirshenbaum M, Orvieto R. Premature ovarian insufficiency (POI) and autoimmunity-an update appraisal. *J Assist Reprod Genet*. 2019 Nov;36(11):2207-2215. doi: 10.1007/s10815-019-01572-0.

La Marca A, Argento C, Sighinolfi G, Grisendi V, Carbone M, D'Ippolito G, Artenisio AC, Stabile G, Volpe A. Possibilities and limits of ovarian reserve testing in ART. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 Mar;13(3):398-408. doi: 10.2174/138920112799361972.

Lavorgna L, Esposito S, Lanzillo R, Sparaco M, Ippolito D, Cocco E, Fenu G, Borriello G, De Mercanti S, Frau J, Capuano R, Trojsi F, Rosa L, Clerico M, Laroni A, Morra VB, Tedeschi G, Bonavita S. Factors interfering with parenthood decision-making in an Italian sample of people with multiple sclerosis: an exploratory online survey. *J Neurol*. 2019 Mar;266(3):707-716. doi: 10.1007/s00415-019-09193-4.

Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 20;24(18):2917-31. doi: 10.1200/JCO.2006.06.5888. Epub 2006 May 1. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5790. PMID: 16651642.

Leray E, Moreau T, Fromont A, Edan G. Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2016 Jan;172(1):3-13. doi: 10.1016/j.neurol.2015.10.006.

Levi Setti PE, Porcu E, Patrizio P, Vigiliano V, de Luca R, d'Aloja P, Spoletini R, Scaravelli G. Human oocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry data, 2007-2011. *Fertil Steril*. 2014 Jul;102(1):90-95.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.03.052.

Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, Quinn G, Wallace WH, Oktay K; American Society of Clinical Oncology. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Jul 1;31(19):2500-10. doi: 10.1200/JCO.2013.49.2678.

Luo W, Mao P, Zhang L, Chen X, Yang Z. Assessment of ovarian reserve by serum anti-Müllerian hormone in patients with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Ann Palliat Med*. 2020 Mar;9(2):207-215. doi: 10.21037/apm.2020.02.11.

Maglione A, Rolla S, Mercanti SF, Cutrupi S, Clerico M. The Adaptive Immune System in Multiple Sclerosis: An Estrogen-Mediated Point of View. *Cells*. 2019 Oct 19;8(10):1280. doi: 10.3390/cells8101280.

Maheshwari A, Gibreel A, Bhattacharya S, Johnson NP. Dynamic tests of ovarian reserve: a systematic review of diagnostic accuracy. *Reprod Biomed Online*. 2009 May;18(5):717-34. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60019-3.

Martins NFE, Seixas MI, Pereira JP, Costa MM, Fonseca JE. Anti-müllerian hormone and ovarian reserve in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2017 Dec;36(12):2853-2854. doi: 10.1007/s10067-017-3797-0.

McCombe PA, Stenager E. Female infertility and multiple sclerosis: is this an issue? *Mult Scler*. 2015 Jan;21(1):5-7. doi: 10.1177/1352458514549406.

McNicholas N, Hutchinson M, McGuigan C, Chataway J. 2017 McDonald diagnostic criteria: A review of the evidence. *Mult Scler Relat Disord*. 2018 Aug;24:48-54. doi: 10.1016/j.msard.2018.05.011. Epub 2018 Jun 21.

Miletta M, Bogliatto F, Bacchio L. Multidisciplinary Management of Sexual Dysfunction, Perineal Pain, and Elimination Dysfunction in a Woman with Multiple Sclerosis. *Int J MS Care*. 2017 Jan-Feb;19(1):25-28. doi: 10.7224/1537-2073.2015-082.

Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2014 Apr-May;13(4-5):518-24. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.012.

Moberg JY, Laursen B, Thygesen LC, Magyari M. Reproductive history of the Danish multiple sclerosis population: A register-based study. *Mult Scler*. 2020 Jul;26(8):902-911. doi: 10.1177/1352458519851245.

Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Nov 1;105(11):3361–73. doi: 10.1210/clinem/dgaa513.

Mormile R, Vittori G. Endometriosis and susceptibility to multiple sclerosis: is there any absolute truth? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014 Aug;179:253. doi: 10.1016/j.ejogrb.2014.04.044.

Niederwieser G, Buchinger W, Bonelli RM, Berghold A, Reisecker F, Költringer P, Archelos JJ. Prevalence of autoimmune thyroiditis and non-immune thyroid disease in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2003 Jun;250(6):672-5. doi: 10.1007/s00415-003-1053-9.

Nørgaard M, Veres K, Didden EM, Wormser D, Magyari M. Multiple sclerosis and cancer incidence: A Danish nationwide cohort study. *Mult Scler Relat Disord*. 2019 Feb;28:81-85. doi: 10.1016/j.msard.2018.12.014.

Oktay K, Türkçüoğlu I, Rodriguez-Wallberg KA. GnRH agonist trigger for women with breast cancer undergoing fertility preservation by aromatase inhibitor/FSH stimulation. *Reprod Biomed Online*. 2010 Jun;20(6):783-8. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.03.004.

Paramanathan J, Talmor AJ, Osianlis T, Weston GC. Cryopreserved oocytes: update on clinical applications and success rates. *Obstet Gynecol Surv.* 2015 Feb;70(2):97-114. doi: 10.1097/OGX.000000000000152.

Patas K, Engler JB, Friese MA, Gold SM. Pregnancy and multiple sclerosis: fetomaternal immune cross talk and its implications for disease activity. *J Reprod Immunol.* 2013 Mar;97(1):140-6. doi: 10.1016/j.jri.2012.10.005.

Peccatori FA, Azim HA Jr, Orecchia R, Hoekstra HJ, Pavlidis N, Kesic V, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. Cancer, pregnancy and fertility: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013 Oct;24 Suppl 6:vi160-70. doi: 10.1093/annonc/mdt199.

Ponsonby AL, Lucas RM, van der Mei IA, Dear K, Valery PC, Pender MP, Taylor BV, Kilpatrick TJ, Coulthard A, Chapman C, Williams D, McMichael AJ, Dwyer T. Offspring number, pregnancy, and risk of a first clinical demyelinating event: the AusImmune Study. *Neurology.* 2012 Mar 20;78(12):867-74. doi: 10.1212/WNL.0b013e31824c4648.

Poppe K, Velkeniers B. Female infertility and the thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;18(2):153-65. doi: 10.1016/j.beem.2004.03.004.

Poser S. Symptomatology and diagnosis of multiple sclerosis. *JAMA.* 1982 Sep 3;248(9):1065.

Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril.* 2013 Jan;99(1):37-43. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.028.

Ramagopalan SV, Guimond C, Criscuoli M, Dymment DA, Orton SM, Yee IM, Ebers GC, Sadovnick D. Congenital abnormalities and multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2010 Nov 16;10:115. doi: 10.1186/1471-2377-10-115.

Rienzi L, Cobo A, Paffoni A, Scarduelli C, Capalbo A, Vajta G, Remohí J, Ragni G, Ubaldi FM. Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum Reprod.* 2012 Jun;27(6):1606-12. doi: 10.1093/humrep/des088.

Sadeghpour N, Mirmosayyeb O, Bjørklund G, Shaygannejad V. Is Fertility Affected in Women of Childbearing Age with Multiple Sclerosis or Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder? *J Mol Neurosci*. 2020 Nov;70(11):1829-1835. doi: 10.1007/s12031-020-01576-x. Epub 2020 Aug 1.

Schneider A, Saccon TD, Garcia DN, Zanini BM, Isola JVV, Hense JD, Alvarado-Rincón JA, Cavalcante MB, Mason JB, Stout MB, Bartke A, Masternak MM. The Interconnections Between Somatic and Ovarian Aging in Murine Models. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2021 Aug 13;76(9):1579-1586. doi: 10.1093/gerona/glaa258.

Schover LR. Patient attitudes toward fertility preservation. *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Aug;53(2):281-4. doi: 10.1002/pbc.22001.

Sepúlveda M, Ros C, Martínez-Lapiscina EH, Solà-Valls N, Hervàs M, Llufríu S, La Puma D, Casals E, Blanco Y, Villoslada P, Graus F, Castelo-Branco C, Saiz A. Pituitary-ovary axis and ovarian reserve in fertile women with multiple sclerosis: A pilot study. *Mult Scler*. 2016 Apr;22(4):564-8. doi: 10.1177/1352458515602339. Epub 2015 Sep 11.

Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, Alegretti JR, Motta EL. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril*. 2010 Nov;94(6):2088-95. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.12.065.

Smith R, Studd JW. A pilot study of the effect upon multiple sclerosis of the menopause, hormone replacement therapy and the menstrual cycle. *J R Soc Med*. 1992 Oct;85(10):612-3.

Szeliga A, Calik-Ksepka A, Maciejewska-Jeske M, Grymowicz M, Smolarczyk K, Kostrzak A, Smolarczyk R, Rudnicka E, Meczekalski B. Autoimmune Diseases in Patients with Premature Ovarian Insufficiency-Our Current State of Knowledge. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 5;22(5):2594. doi: 10.3390/ijms22052594.

Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am J Obstet Gynecol*. 2017 Aug;217(2):129-140. doi: 10.1016/j.ajog.2017.02.027.

Then Bergh F, Kümpfel T, Trenkwalder C, Rupprecht R, Holsboer F. Dysregulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis is related to the clinical course of MS. *Neurology*. 1999 Sep 11;53(4):772-7. doi: 10.1212/wnl.53.4.772.

Thöne J, Kleiter I, Stahl A, Ellrichmann G, Gold R, Hellwig K. Relevance of endoglin, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and anti-ovarian antibodies in females with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2016 Mar 15;362:240-3. doi: 10.1016/j.jns.2016.01.057. Epub 2016 Jan 28.

Thöne J, Kollar S, Nosome D, Ellrichmann G, Kleiter I, Gold R, Hellwig K. Serum anti-Müllerian hormone levels in reproductive-age women with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2015 Jan;21(1):41-7. doi: 10.1177/1352458514540843. Epub 2014 Aug 21.

Venturella R, Lico D, Sarica A, Falbo MP, Gulletta E, Morelli M, Zupi E, Cevenini G, Cannataro M, Zullo F. OvAge: a new methodology to quantify ovarian reserve combining clinical, biochemical and 3D-ultrasonographic parameters. *J Ovarian Res.* 2015 Apr 8;8:21. Doi: 10.1186/s13048-015-0149-z.

Voskuhl R, Momtazee C. Pregnancy: Effect on Multiple Sclerosis, Treatment Considerations, and Breastfeeding. *Neurotherapeutics.* 2017 Oct;14(4):974-984. doi: 10.1007/s13311-017-0562-7.

Yanushpolsky EH, Hurwitz S, Tikh E, Racowsky C. Predictive usefulness of cycle day 10 follicle-stimulating hormone level in a clomiphene citrate challenge test for in vitro fertilization outcome in women younger than 40 years of age. *Fertil Steril.* 2003 Jul;80(1):111-5. doi: 10.1016/s0015-0282(03)00499-0.

Ysraelit MC, Correale J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology.* 2019 Jan;156(1):9-22. doi: 10.1111/imm.13004.

Zhao N, Zhang C, Ding J, Wu H, Cheng W, Li M, Zhu R, Li H. Altered T lymphocyte subtypes and cytokine profiles in follicular fluid associated with diminished ovary reserve. *Am J Reprod Immunol.* 2022 Jan 10:e13522. doi: 10.1111/aji.13522. Epub ahead of print.

Zhao S, Wang J, Liu Y, Luo L, Zhu Z, Li E, Zhao Z. Association Between Multiple Sclerosis and Risk of Female Sexual Dysfunction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Sex Med.* 2018 Dec;15(12):1716-1727. doi: 10.1016/j.jsxm.2018.09.016.