

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Scuola di Dottorato in Neuroscienze – XXXIV ciclo

*Coordinatore - Ch.mo Prof Maurizio Tagliatela*

Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive e Odontostomatologiche

Tesi di Dottorato

STRATEGIE DI OTTIMIZZAZIONE DELLE TECNICHE DI PROCREAZIONE  
MEDICALMENTE ASSISTITA MEDIANTE MANIPOLAZIONE DELL'ASSE IPOTALAMO –  
IPOFISARIO AI FINI DEL RECLUTAMENTO FOLLICOLARE

Relatore  
Ch.mo  
Prof. Carlo Alviggi

Candidato  
Dott.ssa  
Silvia Picarelli

Anno Accademico 2020 - 2021

## **INDICE**

### **INTRODUZIONE**

1. L'asse ipotalamo-ipofisi e il ciclo ovarico.....	1
2. La stimolazione ovarica controllata	
Razionale e cenni fisiologici.....	6

### **1ª SEZIONE SPERIMENTALE**

3. Farmacogenomica	
Basi di partenza scientifica.....	11
3.1 Materiali e metodi.....	18
3.2 Risultati.....	23
3.3 Discussione.....	33

### **2ª SEZIONE SPERIMENTALE**

4. L'ottimizzazione della resa ovarica attraverso le onde follicolari multiple: applicazione clinica dell'approccio Duostim	
Basi di partenza scientifica.....	38
4.1 Materiali e metodi.....	46
4.2 Risultati.....	53
4.3 Discussione.....	54

<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>59</b>
--------------------------	-----------

## INTRODUZIONE

### 1. L'asse ipotalamo-ipofisi e il ciclo ovarico

L'interazione ormonale tra ipotalamo, ipofisi e ovaie regola il sistema riproduttivo femminile. La follicologenesi, in particolare, rappresenta la risultante di un complesso fenomeno mediato da segnali neuroendocrini che riconoscono nell'asse ipotalamo-ipofisi il principale sistema regolatore. Più nello specifico, quest'ultimo orchestra e regola attraverso interazioni (*feedback*) di tipo positivo e negativo ogni singolo fenomeno endocrino all'interno del processo, configurando un sistema "circolare" di interconnessioni reciproche. All'interno di tale sistema, l'ipotalamo è responsabile dell'attivazione di una serie di fenomeni molecolari che, a cascata e mediante dialogo con l'ipofisi anteriore, culminano nella sintesi e nel rilascio di ormoni sessuali in grado, a loro volta, di regolare l'attività dei centri nervosi superiori.

Nel nucleo arcuato dell'ipotalamo medio-basale e nell'area preottica dell'ipotalamo anteriore, un complesso sistema neuronale, in particolare, è responsabile della produzione e del rilascio dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (*Gonadotropin Releasing Hormone - GnRH*), un decapeptide a catena singola. L'increzione di tale molecola non avviene in maniera costante durante l'intero ciclo; lo stimolo, al contrario, si estrinseca mediante brevi momenti di immissione in circolo (*pulses*) sottoposti a fine regolazione neuroendocrina. E' noto come le dinamiche di modulazione della frequenza e dell'ampiezza dei *pulses* di GnRH risultino cruciali per il conseguente rilascio delle gonadotropine ipofisarie (Knobil, 1980); numerosi disordini riproduttivi in donne affette da ipogonadismo ipogonadotropo, iperprolattinemia e sindrome dell'ovaio policistico (*Polycystic Ovary Syndrome - PCOs*) sono infatti associati ad alterazioni dei normali *pulses* GnRH correlati (Tsutsumi *et al.*, 2009).

Attraverso il sistema assonale, l'ipotalamo medio-basale raggiunge l'eminenza mediana, terminando in un insieme di bottoni vascolari sul vaso portale primario. Nel contesto di tale sistema portale, il GnRH stimola sull'adenoipofisi la sintesi e il successivo rilascio dell'ormone follicolo stimolante (*Follicle Stimulating Hormone - FSH*) e dell'ormone luteinizzante (*Luteinizing Hormone*

- LH) ipofisari. Tali molecole, il cui bersaglio nella donna è rappresentato dall'ovaio, sono a loro volta cruciali per lo sviluppo della gonade femminile e responsabili dei fini meccanismi di regolazione della funzione endocrina e riproduttiva dell'organo stesso (Conn *et al.*, 1994). L'interazione del GnRH con le cellule gonadotrope configura un sistema di continuo "ricircolo" di quota parte dei recettori che, in relazione al fenomeno dell'*up-regulation*, ritornano nuovamente attivi sulla membrana plasmatica.

Anche l'increzione delle gonadotropine da parte della ghiandola ipofisaria si esplica attraverso un fenomeno finemente regolato dal punto di vista biochimico ma soprattutto temporale; a un picco rapido che si manifesta nel primo minuto del legame ormone-recettore, segue infatti una seconda fase più lunga e duratura. Il rilascio di LH, in particolare, sembrerebbe seguire dinamiche temporali specifiche e strettamente dipendenti dalle differenti fasi del ciclo mestruale. Nella fase follicolare precoce, infatti, le pulsazioni di LH si verificherebbero, con un'ampiezza moderata, ad intervalli della durata approssimativa di 60-90 minuti. Entro la fase follicolare media, la frequenza delle pulsazioni di LH aumenterebbe a circa una ogni 60 minuti, ma l'ampiezza di ogni impulso tenderebbe a diminuire. Quest'ultima tenderebbe invece ad aumentare considerevolmente verso la fine della fase follicolare. Nella fase luteale precoce, infine, la frequenza delle pulsazioni di LH sembrerebbe rallentare notevolmente, come evidenziato dall'aumento dei livelli di progesterone.

La regolazione reciproca fra centri nervosi superiori e gonade femminile ha ispirato la definizione di una teoria divenuta il principio cardine su cui si basa l'impiego delle gonadotropine esogene nei protocolli di stimolazione ovarica e di induzione della crescita follicolare multipla: "la teoria delle due cellule - due gonadotropine" (Fevold, 1941; Greep *et al.*, 1942). Tale teoria si basa sull'identificazione di due differenti compartimenti ovarici, granulosa e teca interna, che rappresentano i *target* dell'attività biologica dell'FSH e dell'LH, rispettivamente. Il legame molecolare dell'FSH ai suoi specifici recettori, che nella fase follicolare sono espressi prevalentemente sulla superficie delle cellule della granulosa, esplica differenti attività che possono essere ricondotte a tre effetti fondamentali: la proliferazione cellulare, la promozione dell'attività

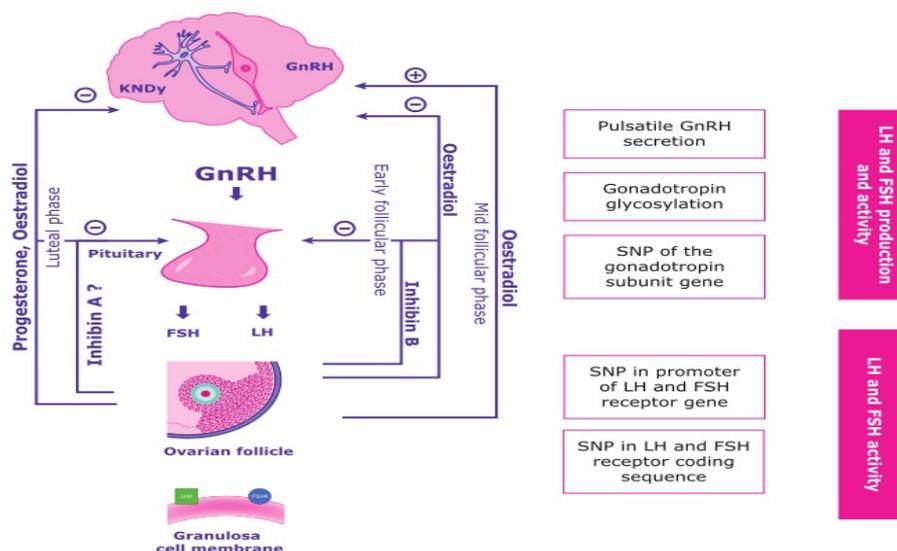
dell'enzima aromatasi, responsabile della conversione del substrato androgenico in 17-beta Estradiolo (E<sub>2</sub>), e l'induzione dell'espressione dei recettori per l'LH. Tale ultimo fenomeno è responsabile dello stabilirsi di un'adeguata ricettività all'LH da parte delle cellule della granulosa durante la fase follicolare intermedio-avanzata.

A tal proposito è importante specificare come l'attività dei centri nervosi superiori si espliciti sull'ovaio in una fase più avanzata della follicologenesi, dove il compartimento cellulare diviene strettamente dipendente dall'attività dell'FSH. Nella prima fase, infatti, un contributo maggiormente rilevante al reclutamento e allo sviluppo dei follicoli primordiali in follicoli primari e secondari sembrerebbe attribuibile ad alcuni fattori intra-ovarici (*Growth Differentiation Factor 9 - GDF9* e *Bone Morphogenetic Protein 15 - BMP15*) (Aaltonen *et al.*, 1999; Knight and Glister, 2003). L'FSH, al contrario, supporterebbe e favorirebbe la maturazione del *pool* di follicoli già precedentemente selezionati per la crescita e dunque più sensibili alla sua stessa attività; i follicoli meno sensibili all'attività della stessa gonadotropina, al contrario, andrebbero incontro a un lento fenomeno di atresia (Maklon and Fauser, 2001). Le basi biochimiche e molecolari di tale fenomeno sono da attribuirsi, in particolare, ad una caduta al di sotto del livello soglia delle concentrazioni sieriche di FSH: tale evento molecolare sarebbe dovuto a un *feedback* negativo determinato dall'estradiolo e dall'inibina B prodotti dal follicolo dominante.

Nel corso di tutta la fase follicolare, l'LH ipofisario esplica prevalentemente la sua attività biologica sulle cellule dello stroma e della teca interna, inducendo la biosintesi degli androgeni [in prevalenza  $\Delta^4$  - Androstenedione ( $\Delta^4$  - A) e Testosterone (T)] a partire dal colesterolo circolante. Questi ultimi diffondono nel compartimento delle cellule della granulosa dove, per effetto dell'aromatasi vengono convertiti in E<sub>2</sub>. Nella fase follicolare avanzata, l'azione dell'LH, promossa a sua volta da un incremento della pulsatilità del GnRH ipotalamico, si estrinseca principalmente, invece, nel compartimento della granulosa e culmina con lo scoppio del follicolo dominante e dunque con l'evento ovulatorio (Schoot *et al.*, 1992). In prossimità dell'ovulazione, infatti, le concentrazioni ematiche di LH diventano massime ad opera del *feedback* positivo esercitato sui centri nervosi dagli

estrogeni. Tale fenomeno, dopo un'iniziale periodo di stimolazione, provoca tuttavia un effetto inibitorio sulla steroidogenesi che si traduce in una brusca caduta preovulatoria della secrezione di estrogeni e androgeni all'interno del follicolo. L'LH promuove un arresto della proliferazione delle cellule della granulosa a cui fa seguito l'inizio della secrezione intrafollicolare di progesterone con il fenomeno della luteinizzazione. Il picco ipofisario preovulatorio dell'LH è infine responsabile della maturazione dell'ovocita, con conseguente ripristino della divisione meiotica, arrestatasi durante la vita fetale, ed estrusione del primo globulo polare (Sullivan *et al.*, 1999). Dopo l'ovulazione, la luteinizzazione del follicolo rotto induce la secrezione di progesterone, che esercita un *feedback* negativo sull'ipotalamo, riducendo così la frequenza dell'impulso GnRH. Con la scomparsa del corpo luteo, infine, i livelli di estrogeni, progesterone e inibina A diminuiscono bruscamente mentre la frequenza degli impulsi di GnRH e la conseguente secrezione di FSH aumentano nuovamente promuovendo un nuovo e successivo ciclo di follicologenesi (Marut *et al.*, 1981; Moenter *et al.*, 1992).

Nella figura 1 sono schematizzate le dinamiche di regolazione reciproca (*feedback* positivo e negativo) dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio.



**Figura 1.** Dinamiche di regolazione reciproca (*feedback* positivo e negativo) dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio (Bosch - Alviggi *et al.*, 2021)

Da quanto appena accennato, appare dunque chiaro come i processi di follicologenesi e il ciclo ovarico siano eventi finemente regolati mediante un complesso sistema di dialogo fra i compartimenti ipotalamo, ipofisi e gonade. L'acquisizione dei delicati meccanismi molecolari che sottendono tali fenomeni ha consentito di mettere in atto strategie di "modulazione" dell'asse neuroendocrino che, nel campo della medicina della riproduzione, convergono su un obiettivo comune: l'ottimizzazione della resa ovarica mediante la crescita follicolare multipla. Lo scopo della Stimolazione Ovarica Controllata (*Controlled Ovarian Stimulation* - COS) è infatti quello di superare i meccanismi che sono alla base della selezione del follicolo dominante sovvertendo l'algoritmo neuroendocrino della monovulazione, con l'obiettivo di favorire un reclutamento e quindi una crescita follicolare multipla; tale strategia è a sua volta finalizzata all'ottenimento di un adeguato recupero ovocitario, cruciale per incrementare le probabilità di concepimento. Per ottenere questo obiettivo è necessario che l'ovaio sia stimolato con gonadotropine esogene e quindi in maniera avulsa dalla regolazione diretta da parte dell'asse neuroendocrino ipotalamo-ipofisi. Descriveremo dunque nel paragrafo successivo il razionale della COS e i farmaci principalmente impiegati.

## 2. La stimolazione ovarica controllata

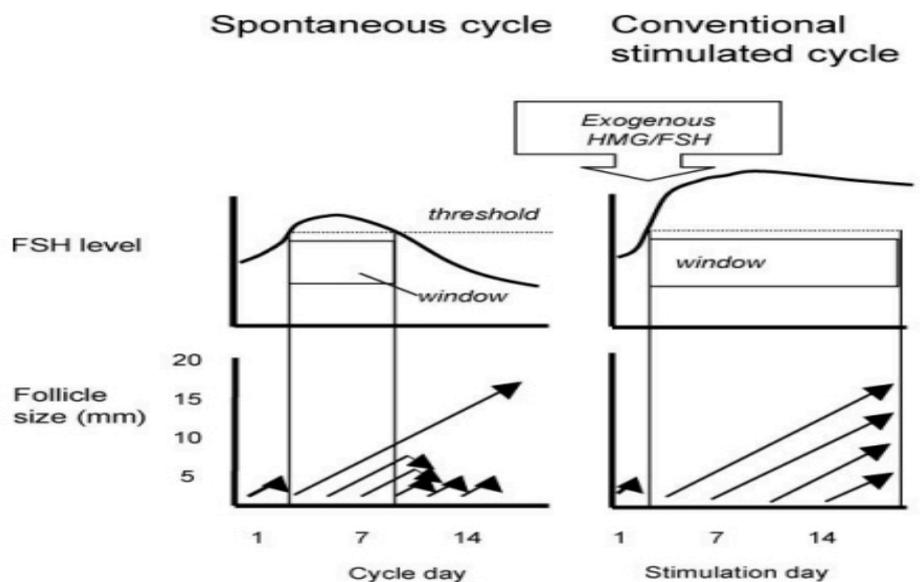
### Razionale e cenni fisiologici

Ai fini di una fisiologica ovulazione è cruciale che in ogni ciclo ovarico l'ipofisi produca quantità plasmatiche di FSH tali da raggiungere un valore soglia. Tale concetto (FSH *threshold*), ipotizzato per la prima volta alla fine degli anni '70, riassume in sé le dinamiche molecolari responsabili della stretta relazione che intercorre fra crescita follicolare e attività dei centri nervosi ipotalamo-ipofisari. Più in particolare, tale teoria evidenzia come i livelli di FSH ipofisari debbano superare una concentrazione "soglia" affinché possa avviarsi la fase finale di crescita, gonadotropino-dipendente, del follicolo (Brown, 1978; Schoemaker *et al.*, 1993; Ben-Rafael *et al.*, 1995). Nel ciclo mestruale umano e più nello specifico nella fase follicolare precoce, infatti, incrementi di solo il 30% dei livelli plasmatici di FSH, dovuti ad un iniziale fenomeno di riduzione del *feedback* negativo esercitato dall'estradiolo (Messinis and Templeton, 1990), risultano sufficienti per avviare la crescita dei follicoli ovarici più sensibili (Schipper *et al.*, 1998; Macklon *et al.*, 2006). Sebbene ogni follicolo in crescita abbia inizialmente lo stesso potenziale per raggiungere la piena maturazione, solo quei follicoli che raggiungono una fase più avanzata di maturazione guadagnano la dipendenza dalle gonadotropine e continuano a crescere. In una fase successiva del processo di maturazione follicolare e poco prima dell'evento ovulatorio, al contrario, una riduzione della secrezione di FSH si traduce in un *feedback* negativo sui centri ipotalamo-ipofisari. Evidenze scientifiche dimostrano, in particolare, come i livelli plasmatici dell'FSH ipofisario riflettano in maniera inversamente proporzionale le dimensioni della coorte follicolare reclutata (Chang *et al.*, 1998). All'interno del follicolo in cui si è instaurata la dominanza, infatti, aumenta considerevolmente la produzione di estrogeni e inibina B, che, a loro volta, riducono il rilascio di ulteriori quote di FSH da parte dell'ipofisi. Tale evento è principalmente da ascrivere ad una maggiore sensibilità del follicolo dominante all'FSH (con l'espressione di un maggior numero di recettori per l'FSH), tale da non risentire della sua contemporanea diminuita concentrazione (Van Santbrink *et al.*, 1995). Quest'ultimo fenomeno ha la funzione di limitare la "finestra dell'FSH"

(FSH *window*) che rappresenta il periodo durante il quale i livelli di FSH rimangono sopra la soglia per prevenire l'atresia dei follicoli non dominanti (Macklon *et al.*, 2006; Hassan *et al.*, 2017). Al contempo, il follicolo dominante diviene più sensibile alla stimolazione gonadotropinica acquisendo sensibilità all'LH e mantenendo la capacità di crescere nonostante la riduzione dei livelli plasmatici di FSH; tutti i follicoli subordinati della coorte, al contrario, interrompono la loro crescita e lentamente vanno incontro a fenomeni di atresia perché non adeguatamente sostenuti dall'FSH.

A ridosso dei primi anni '80, evidenze scientifiche suggerirono che mentre un aumento delle concentrazioni di FSH di solo il 10-30% sopra il livello di soglia fosse sufficiente a stimolare il normale sviluppo del follicolo, un ulteriore incremento causasse una stimolazione sopra soglia e dunque "eccessiva" (Brown, 1978). Nel corso degli anni, fu effettivamente dimostrato come la somministrazione di gonadotropine esogene a concentrazioni maggiori e in una finestra temporale più ampia, a partire dalla fase follicolare precoce, potesse condurre al persistente innalzamento dei valori di FSH al di sopra del valore soglia; tale meccanismo, sovvertendo il dialogo con i centri ipotalamo-ipofisari, impediva l'instaurarsi dei fenomeni di selezione del singolo follicolo dominante.

Il concetto stesso di induzione della crescita follicolare multipla racchiude in sé tutti i delicati e complessi meccanismi fisiologici attraverso i quali l'attività ovarica viene "svincolata" dal controllo da parte dei centri nervosi superiori. Nei cicli di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA), infatti, dosi sovrafisiologiche di FSH vengono somministrate per mantenere i livelli sierici di FSH al di sopra della fisiologica soglia responsabile dell'evento "monovulazione"; tale fenomeno permette di estendere la finestra dell'FSH e promuovere la crescita multifollicolare (Macklon and Fauser, 2000; Yong *et al.* 2003). Ne consegue, dunque, lo sviluppo sincrono e la maturazione di tutta la coorte follicolare precedentemente reclutata e destinata fisiologicamente a fenomeni di atresia (Schipper *et al.*, 1992) (Figura 2).



**Figura 2.** Concetto di FSH *threshold* e FSH *window* nel ciclo ovarico spontaneo e nei protocolli di COS (Macklon *et al.*, 2006)

La figura 2 mostra la relazione fra l'aumento dei livelli di FSH e la crescita follicolare. Nel riquadro a sinistra si evidenzia come in un ciclo spontaneo i livelli sopra soglia di FSH in un intervallo di tempo più breve (FSH *window*) siano responsabili della crescita di un singolo follicolo. Nel riquadro a destra, al contrario, è mostrato come all'aumento dei livelli di FSH ad un valore soglia più elevato e in una finestra temporale più ampia (durante tutta la fase follicolare medio-avanzata) segua un fenomeno di crescita follicolare multipla e di inibizione dei fenomeni di atresia della coorte follicolare subordinata.

Su tale razionale si basa l'impiego dei farmaci nei cicli di COS. Scopo del reclutamento follicolare multiplo è infatti la massimizzazione della resa ovarica e l'ottenimento di un numero di ovociti adeguato. Dall'analisi retrospettiva di Sunkara *et al.* effettuata su 400.135 cicli emerge, infatti, come il principale parametro in grado di predire il *Live Birth Rate* (LBR) sia rappresentato dal numero di ovociti recuperati, con il tasso di gravidanza maggiore per un numero di ovociti pari a 15 (Sunkara *et al.*, 2011). Il numero di ovociti recuperati, a tutt'oggi, rappresenta il principale fattore prognostico

nei cicli di COS (Fauser *et al.*, 2005). Subordinare il tipo e il dosaggio delle gonadotropine alle caratteristiche della singola paziente rappresenta uno degli *step* più cruciali dell'intero processo, influenzando sia il successo sia la sicurezza dei protocolli, e ha dato il via ad un importante filone nel campo della medicina della riproduzione basato sul concetto della personalizzazione della terapia (Yovich *et al.*, 2016).

Al fine di consentire il pieno controllo della follicologenesi multipla da parte delle gonadotropine esogene e prevenire, dunque, possibili attivazioni delle connessioni funzionali dell'ovaio con l'unità ipotalamo-ipofisaria (*feedback* positivo mediato dagli estrogeni), nei cicli di COS sono stati introdotti gli analoghi del GnRH (Edwards *et al.*, 1996). L'obiettivo dell'impiego di tali molecole è infatti quello di sopprimere la produzione di FSH e LH da parte dell'asse ipotalamo-ipofisario (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Ne risulta la possibilità di un controllo ottimale del ciclo, poiché la crescita dei follicoli, tramite FSH esogeno, può essere protratta sino al punto desiderato, senza incorrere nel rischio di rotture spontanee dei follicoli stessi, conseguenti a picchi endogeni di LH, con relativa irrimediabile perdita degli ovociti in essi contenuti. In tal modo viene evitata la luteinizzazione, fenomeno frequentemente osservato nei protocolli di stimolazione che prevedevano l'utilizzo delle sole gonadotropine.

I meccanismi d'azione degli agonisti e degli antagonisti del GnRH (GnRH-a e GnRH-ant, rispettivamente) sono completamente differenti. I GnRH-a, dopo un iniziale effetto stimolante (*flare-up*), conducono a desensibilizzazione delle cellule gonadotrope e a una riduzione del numero di recettori del GnRH sulla membrana delle cellule (*down-regulation*) (Huirne *et al.*, 2007; Lambalk *et al.*, 2017). Questo fenomeno è a sua volta responsabile della riduzione del rilascio di FSH e di LH e, in ultimo, dell'inibizione della produzione di estrogeni e androgeni. Una singola iniezione di GnRH-a provoca quindi una iniziale stimolazione delle cellule ipofisarie, con conseguente secrezione di FSH e di LH e la risposta gonadica prevista. La somministrazione continua o ripetuta di un agonista in maniera non pulsatile o la somministrazione di dosi sovralfisiologiche, invece, determina l'inibizione dell'asse ipofisi-gonade.

I GnRH-ant, al contrario, producono un effetto immediato, competendo con i recettori per il GnRH ipofisari, occupandoli e bloccando l'accesso del GnRH endogeno e degli agonisti esogeni; a tale fenomeno fa seguito la riduzione, entro qualche ora, dei livelli sierici di FSH e LH. Esplicando l'effetto inibitorio in tempi rapidi, tali molecole consentono una certa flessibilità nel grado di soppressione ipofisaria-gonadica. La sospensione del trattamento con GnRH-ant, inoltre, conduce a un rapido recupero dell'asse ipofisi-gonade (Gordon and Hodgen, 1992; Duijkers *et al.*, 1998; Cheung *et al.*, 2005; Huirne *et al.*, 2007). Tali caratteristiche d'azione rendono l'approccio farmacologico alla PMA particolarmente vantaggioso e semplificato, oltre che flessibile, consentendo relativa sicurezza nella somministrazione delle gonadotropine esogene.

L'impiego dei GnRH-a si avvale oggi, principalmente, dell'applicazione di due differenti schemi di trattamento nella pratica clinica, a seconda che si prediliga la soppressione ipofisaria completa o che si sfrutti l'effetto *flare-up* iniziale delle gonadotropine per la stimolazione ovarica. Quest'ultimo effetto può essere sfruttato per indurre l'ovulazione al posto della gonadotropina corionica umana (*Human Chorionic Gonadotropin* - hCG), riducendo notevolmente il rischio di Sindrome da Iperstimolazione Ovarica (*Ovarian Hyperstimulation Syndrome* - OHSS) (Youssef *et al.*, 2014).

I GnRH-ant, al contrario, possono essere utilizzati secondo due principali schemi di trattamento. Lo schema fisso prevede la somministrazione di tali molecole a partire dal 5°- 6° giorno di stimolazione, indipendentemente dalla risposta ovarica e/o dai livelli di E<sub>2</sub>. Lo schema flessibile, al contrario, subordina l'introduzione dei GnRH-ant all'evidenza ecografica di un follicolo di almeno 14 mm. Robusti dati della letteratura dimostrano che l'introduzione nella pratica clinica dei GnRH-ant ha consentito una riduzione nella durata dei protocolli di stimolazione, nella dose complessiva di gonadotropine utilizzata e nell'incidenza del rischio di OHSS (Al-Inany *et al.*, 2011; Al-Inany *et al.*, 2016; Lambalk *et al.*, 2017).

## 1ª SEZIONE SPERIMENTALE

### 3. Farmacogenomica

#### Basi di partenza scientifica

Nell'ambito del vasto e complesso capitolo dell'infertilità di coppia, recentemente, il Comitato Internazionale per il Monitoraggio delle Tecnologie di Riproduzione Assistita (*International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies - ICMART*) ha fornito una definizione più ampia del concetto di "ipogonadismo ipogonadotropo". Definendo tale condizione come "insufficienza gonadica associata a ridotta gametogenesi e produzione di steroidi e causata da una diminuita produzione o azione delle gonadotropine" (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017), ancora una volta, si è identificato il ruolo determinante dell'asse ipotalamo-ipofisi nel controllo e nella fisiologica regolazione della funzionalità endocrina e riproduttiva dell'ovaio. Mentre le cause della ridotta produzione di LH e FSH sono ben note e ampiamente descritte in letteratura (White e Kaiser, 2009), il *deficit* funzionale di tali molecole ha ricevuto molta meno attenzione nell'ambito della comunità scientifica, sebbene, ne sia stato riconosciuto un ruolo rilevante nell'ambito della fertilità umana e, più nello specifico, nell'ambito delle procedure di PMA, dove tale fenomeno si riflette in maniera diretta in un peggioramento degli *outcome* di tipo riproduttivo. All'interno del recente filone di studio avente come oggetto tale fenomeno, l'interesse clinico e scientifico si è principalmente focalizzato sulle cause di natura genetica.

Tale evidenza emerge dopo circa un ventennio di approcci clinici standardizzati, basati sull'utilizzo di protocolli di stimolazione con gonadotropine esogene a dosaggi *standard*, stabiliti sostanzialmente su parametri demografici ed antropometrici, ossia in base all'età ed all'indice di massa corporea (*Body Mass Index - BMI*). Nell'arco degli ultimi anni si è osservato come tale approccio (*one size fits all*) non è sufficiente, nel senso che a parità di età, di BMI e di riserva ovarica, le pazienti possono mostrare differenti profili di "sensibilità" o resistenza alle gonadotropine endogene ed esogene (De Placido *et al.*, 2001; De Placido *et al.*, 2005).

Tale concetto è stato introdotto per la prima volta negli ultimi anni sulla base di recenti osservazioni che mettevano in luce come, nella normale pratica clinica, la risposta ovarica ai protocolli di stimolazione con dosi *standard* di FSH ricombinante (*Recombinant Human FSH - r-hFSH*) molecola principalmente utilizzata nelle pazienti normogonadotrope, risultasse ottimale in una percentuale pari all'85% dei casi traducendosi nel recupero di più di 5 ovociti maturi. In circa il 12-15% dei casi, invece, si riscontrava una scarsa risposta iniziale a cui seguiva la necessità di incrementare la dose quotidiana di FSH da somministrare; in tali pazienti, dunque, si osservava un consumo totale di FSH esogeno maggiore (>2500 UI) (Alviggi *et al.*, 2011; Alviggi *et al.*, 2013). Tali osservazioni hanno sollevato non poche perplessità circa il concetto di *poor responders* fino a quel momento utilizzato per identificare pazienti a bassa prognosi riproduttiva e con scarsa riserva ovarica. Secondo i criteri di Ferraretti *et al.* almeno due delle seguenti caratteristiche identificavano tale sottogruppo di pazienti: età materna avanzata (>40 anni) o qualsiasi altro fattore di rischio per una scarsa risposta ovarica, pregressa scarsa risposta ovarica ad un protocollo di stimolazione convenzionale (<3 ovociti) e *markers* di riserva ovarica ridotti (Ferraretti *et al.*, 2011). Risposte subottimali osservate in pazienti normogonadotrope spingevano tuttavia la comunità scientifica a identificare un ulteriore sottogruppo di pazienti che, a fronte di una normale riserva ovarica, richiedevano dosi maggiori di FSH per ottenere una adeguata risposta alla stimolazione ovarica (in termini di ovociti recuperati) (concetto di *hypo-responders*) (De Placido *et al.*, 2001; De Placido *et al.*, 2005; Devroey *et al.*, 2009; Alviggi *et al.*, 2018a). Più nello specifico, nell'ambito dei protocolli di stimolazione ovarica tale forma di resistenza ovarica si manifestava clinicamente come una "risposta iniziale lenta" (Ferraretti *et al.*, 2004; De Placido *et al.*, 2005) oppure veniva diagnosticata a posteriori in pazienti con normale riserva ovarica che richiedevano dosi di gonadotropine superiori (Ruvolo *et al.*, 2009). Recentemente e a tal proposito sono stati proposti, ai fini della misurazione della risposta ovarica alla stimolazione, due indici basati sulla riserva ovarica individuale: il *Follicular Output Rate* (FORT) (Genro *et al.*, 2011; Gallot *et al.*, 2012) e il *Follicle to Oocyte Index* (FOI) (Alviggi *et al.*, 2018b). L'indice FORT è rappresentato dal rapporto fra il

numero di follicoli preovulatori ottenuti in risposta alla somministrazione di r-hFSH e misurati il giorno dell'induzione dell'ovulazione e il numero di follicoli antrali totali. Al contrario, il FOI identifica il rapporto tra il numero di ovociti raccolti al *pick up* e il numero di follicoli antrali presenti all'inizio della stimolazione ovarica. Tali indici, nell'ambito della pratica clinica, sembrerebbero rappresentare un indicatore diretto della risposta individuale alla stimolazione ovarica, identificando in maniera più precisa, rispetto al solo numero di ovociti, sottocategorie di pazienti con una risposta subottimale alle gonadotropine esogene.

Sulla base di tali evidenze cliniche è stata pertanto sollevata l'ipotesi che, oltre alle caratteristiche demografiche, antropometriche ed ai principali *markers* di riserva ovarica [Conta dei Follicoli Antrali (*Antral Follicular Count* - AFC) e Ormone Anti-Mulleriano (*Anti-Mullerian Hormone* - AMH)], anche varianti geniche possano condizionare la risposta individuale alla COS (Altamae *et al.*, 2011). Sin dall'inizio la ricerca clinica si è orientata sullo studio delle varianti alleliche delle gonadotropine e dei loro recettori. Diversi studi hanno mostrato che la presenza di specifici polimorfismi delle gonadotropine e dei loro recettori sia in grado o di ridurre l'azione biologica della gonadotropina stessa o di modificare la "sensibilità" dell'ovaio alle gonadotropine esogene, portando ad una risposta "inattesa" ai comuni protocolli *standard* di stimolazione (Huhtaniemi *et al.*, 1999; Alviggi *et al.*, 2009a; Altmae *et al.*, 2011a; Alviggi *et al.*, 2013; La Marca *et al.*, 2013; Alviggi *et al.*, 2015; Conforti *et al.*, 2019a).

Nell'ambito della medicina della riproduzione, con particolare riferimento all'influenza delle varianti geniche sulla COS, il polimorfismo maggiormente studiato ad oggi si trova sull'esone 10 del recettore dell'FSH (FSHR) in posizione 680 (FSHR Asn680Ser; rs6166). E' importante sottolineare che mentre le mutazioni riguardanti FSHR sono eventi sporadici, i polimorfismi rappresentano un fenomeno comune (Levallet *et al.*, 1999). Alcune varianti di FSHR 680 c.2039G>A (rs6166) sono state associate a livelli più elevati di FSH plasmatico e a un maggiore consumo di FSH in corso di COS (Overbeek *et al.*, 2009; Laisk-Podar *et al.*, 2015; Alviggi *et al.*, 2018a). Numerosi studi hanno dimostrato che pazienti omozigoti Ser/Ser per tale polimorfismo

richiedono dosi maggiori di r-hFSH in corso di stimolazione ovarica (Sudo *et al.*, 2002; Behre *et al.* 2005; Alviggi *et al.*, 2016a; Alviggi *et al.*, 2018a) oltre ad avere livelli di FSH endogeno basali più elevati (Perez Mayorga *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2013). Tali polimorfismi associati al recettore dell'FSH, inoltre, potrebbero spiegare le differenze inter-individuali nel ciclo mestruale. A conferma di tale ultima ipotesi, sono stati infatti osservati cicli mestruali più lunghi nelle portatrici della variante Ser/Ser (Greb *et al.*, 2005).

Anche un polimorfismo nella regione 5' non tradotta dell'FSHR [FSHR G29A (rs1394205)] sembrerebbe influenzare la risposta individuale alle gonadotropine esogene. Studi *in vitro* hanno mostrato che la presenza dell'allele A è caratterizzata da una ridotta attività trascrizionale dell'mRNA e da un ridotto livello della proteina FSHR (Casarini *et al.*, 2014; Riccetti *et al.*, 2017). Le pazienti portatrici di tale polimorfismo in omozigosi (omozigoti AA), difatti, mostrano nell'ambito dei protocolli di stimolazione ovarica un minor numero di ovociti recuperati, un *Pregnancy Rate* (PR) inferiore quando comparate alle pazienti omozigoti GG (Achrekar *et al.* 2009b; Alviggi *et al.*, 2018a) oltre ad un tasso di ovociti MII minore (Desai *et al.*, 2011). Con particolare riferimento a tale polimorfismo i risultati sono tuttavia contrastanti; da un'analisi retrospettiva di 603 pazienti sottoposte a cicli di PMA, infatti, emerge un più elevato LBR per le portatrici del polimorfismo FSHR -29G>A, AA in omozigosi (Tohlob *et al.*, 2016). Da ulteriori evidenze risulta, inoltre, che le portatrici dell'allele A presentino una minore espressione del recettore stesso quando comparate alle portatrici dell'allele G con conseguente minore sensibilità dell'ovaio alla stimolazione (Casarini *et al.*, 2014; Riccetti *et al.*, 2017). Anche i polimorfismi associati alla variante FSHR c.G919A (rs6165), infine, sembrerebbero influenzare in maniera significativa la risposta ovarica nell'ambito dei protocolli di stimolazione senza tuttavia riflettersi in variazioni nella riserva ovarica (Trevisan *et al.*, 2014; Alviggi *et al.*, 2018a). Le mutazioni omozigoti del recettore dell'LH (LHR), d'altra parte, risulterebbero associate a oligomenorrea/amenorrea nonostante il normale sviluppo puberale (Latronico *et al.*, 1998).

Nell'ambito della farmacogenomica numerosi studi si sono focalizzati anche sull'analisi delle varianti geniche delle gonadotropine, oltre che dei loro recettori. Un polimorfismo della molecola FSH che colpisce il promotore della catena beta dell'FSH (c-221 G>T) sembrerebbe, ad esempio, influenzarne l'attività funzionale (Grigorova *et al.*, 2008; Schüring *et al.*, 2013). In uno studio eseguito su donne finlandesi in età riproduttiva, infatti, le portatrici dell'allele T sono risultate caratterizzate da livelli plasmatici aumentati di LH e FSH basali e da infertilità idiopatica (Rull *et al.*, 2018). Ulteriori evidenze emerse da uno studio eseguito su 63.350 pazienti, inoltre, hanno dimostrato come la presenza dell'allele T risulti associato a cicli mestruali più lunghi, età avanzata della menopausa e ridotta incidenza di endometriosi (Ruth *et al.*, 2016).

Le mutazioni del gene dell'LH sembrano essere meno frequenti rispetto a quelle dell'FSH, ma nei soggetti di sesso maschile tali polimorfismi sono stati correlati a pubertà ritardata, riduzione dei livelli sierici di testosterone associati ad incrementi di LH plasmatico e spermatogenesi alterata (Weiss *et al.*, 1992) mentre nelle pazienti di sesso femminile a condizioni di infertilità (Achermann *et al.*, 2002).

Nell'ambito dei programmi di riproduzione assistita, nelle pazienti portatrici di polimorfismi della subunità beta dell'LH [LHB W8R/I15T (rs 1800447)] si osserva una maggiore richiesta di FSH esogeno in corso di stimolazione (Alviggi *et al.*, 2009b; Alviggi *et al.*, 2013). Clinicamente, tali pazienti sono caratterizzate dalla presenza di una forma biologicamente meno attiva di LH, dunque in un supporto meno adeguato all'attività dell'FSH e in una ridotta risposta alla stimolazione ovarica (Alviggi *et al.*, 2009b; Alviggi *et al.*, 2013). La presenza della variante allelica dell'LH è stata riscontrata, tuttavia, in solo il 32% di pazienti *hypo-responders* candidate a PMA; pertanto, il meccanismo patogenetico che sottende una ridotta risposta all'FSH resta sconosciuto in circa i due terzi delle pazienti. Tale polimorfismo, principalmente espresso nella popolazione del Nord Europa, è caratterizzato da una ridotta emivita della molecola *in vivo* quando comparata alla forma *wild type* (Haavisto *et al.*, 1995; Nilsson *et al.*, 1997).

Da uno studio trasversale effettuato su 384 donne candidate a PMA nelle quali è stato studiato il polimorfismo LHCGR A312G, (rs2293275) il PR è risultato più elevato nelle portatrici della variante omozigote Ser/Ser (Lindgren *et al.*, 2016). Le portatrici LHCGR omozigoti Ser/Ser mostravano inoltre una richiesta maggiore di r-hFSH in corso di stimolazione ovarica rispetto alle portatrici omozigoti Asn/Asn. In un ulteriore studio, inoltre, il tasso di gravidanza appariva significativamente più elevato nelle pazienti portatrici del polimorfismo contenente l'aminoacido serina che avevano ricevuto un'associazione di r-hFSH e di LH ricombinante (*Recombinant Human LH - r-hLH*) quando comparate alle pazienti riceventi monoterapia con r-hFSH (Ramaraju *et al.*, 2018).

I polimorfismi dei recettori delle gonadotropine sembrerebbero esercitare il loro effetto sulla stimolazione ovarica anche quando combinati fra loro (Conforti *et al.*, 2017a). Ad esempio è stato osservato che pazienti portatrici della variante in omozigosi Ser/Ser sia per FSHR Asn680Ser sia per LHCGR A312G mostrano un PR più elevato quando comparate con le pazienti portatrici della variante omozigote Asn/Asn (Lindgren *et al.*, 2016). Da una recente analisi retrospettiva, risulta che pazienti omozigoti AA sia per FSHR-29 sia per FSHR Asn680Ser (Asn/Asn) mostrerebbero un aumentato rischio di alterazione della risposta ovarica in corso di stimolazione (Desai *et al.*, 2013).

Portatrici del genotipo FSHB-211 GT + FSHR 2039AA, infine, avrebbero livelli più bassi di FSH al giorno 3 rispetto a portatrici della variante genica FSHB-211 GG/FSHR 2039GG confermando le recenti evidenze circa un possibile effetto additivo di differenti polimorfismi nella regolazione dei livelli sierici di FSH (La Marca *et al.*, 2013).

All'interno di questo filone di ricerca è fondamentale tuttavia sottolineare che la maggior parte degli studi aventi come oggetto l'associazione fra genotipo e risposta alla stimolazione ovarica presenta alcune limitazioni. Si tratta per lo più, infatti, di studi retrospettivi ed eterogenei in termini di protocolli di COS adottati e di pazienti reclutate (Sudo *et al.*, 2002; Achrekar *et al.*, 2009; Nordhoff *et al.*, 2011; Zalewski *et al.*, 2013; Tohlob *et al.*, 2016). Nella quasi totalità dei casi, inoltre viene considerata l'analisi di un singolo polimorfismo (De Castro *et al.*, 2003; Achrekar *et al.*, 2009; Jun

*et al.*, 2006; Genro *et al.*, 2012; Lazaros *et al.*, 2012) e solo recentemente e come precedentemente accennato, l'effetto combinato delle varianti geniche nell'ambito della medicina della riproduzione è stato indagato coinvolgendo non più di due polimorfismi insieme (Desai *et al.*, 2013; Lindgren *et al.*, 2016; Allegra *et al.*, 2017).

Nell'ambito di tale filone, la mia ricerca si è principalmente focalizzata sull'analisi dell'impatto di alcuni polimorfismi delle gonadotropine e dei loro recettori sugli *outcome* riproduttivi all'interno dei cicli di PMA, utilizzando come modello di studio pazienti normogonadotrope a buona prognosi. Più in particolare, lo scopo del presente studio, interventistico non farmacologico, a carattere multicentrico, è stato quello di valutare in maniera prospettica l'effetto, in forma singola e in combinazione tra loro, di differenti polimorfismi delle gonadotropine e loro recettori in pazienti con buona prognosi, sottoposte a COS con GnRH-a (*long protocol*) e *starting doses* fisse di r-hFSH ricombinante.

### 3.1 Materiali e metodi

#### *Popolazione di studio*

Le pazienti oggetto di studio sono state arruolate nell'ambito di 3 differenti centri di PMA:

- Centro di Sterilità ed Infertilità di Coppia, Università di Napoli, Federico II;
- Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Ospedale San Raffaele di Milano;
- Aarhus University, The Fertility Clinic, Skive Regional Hospital, Danimarca.

I criteri di inclusione sono stati rappresentati da:

- età compresa fra i 20 e i 35 anni;
- BMI compreso fra 20 e 27 Kg/m<sup>2</sup>;
- FSH basale  $\leq 10$  UI/L e normale riserva ovarica in accordo con i criteri POSEIDON (AFC  $\geq 5$ ) (POSEIDON group, 2016);
- indicazioni specifiche alla PMA.

I criteri di esclusione sono stati rappresentati da:

- caratteristiche delle pazienti identificabili come *poor responders* secondo i criteri di Bologna (Ferraretti *et al.*, 2011) o a bassa prognosi secondo i criteri POSEIDON (POSEIDON group, 2016);
- disordini endocrini, genetici o autoimmuni;
- diagnosi di PCOs in accordo con i criteri di Rotterdam (ESHRE/ASRM, 2004);
- diagnosi di endometriosi stadio III e IV o elevati livelli di Antigene Carboidratico 125 (CA125) (ASRM, 1997; Patrelli *et al.*, 2011);
- presenza di anomalie della cavità uterina evidenziabili mediante ecografia o isteroscopia;
- storia di precedenti cicli di COS cancellati per insufficiente risposta o nei quali sono stati recuperati meno di 4 ovociti.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Napoli, Federico II.

### *Protocollo di stimolazione*

Le pazienti arruolate per lo studio sono state sottoposte a protocollo di soppressione ipofisaria (*long-protocol*) mediante *down*-regolazione con GnRH-a, in particolare con somministrazione giornaliera di Buserelin acetato (Sanofi SPA, Milano) alle dosi di 0.5 mg s.c. a partire dalla fase medio-luteale del ciclo precedente. Dopo 12-14 giorni, la dose è stata ridotta a 0.2 mg. Circa due settimane dopo l'inizio di tale terapia, le pazienti sono state sottoposte a controlli biochimici ed ecografici per valutare l'avvenuta soppressione. In particolare, sono state considerate rispondenti alla terapia le pazienti che presentavano livelli sierici di E<sub>2</sub> ≤40 pg/ml, uno spessore endometriale ≤5 mm e assenza di formazioni cistiche ovariche valutate mediante ecografia transvaginale. Solo le pazienti che presentavano tali caratteristiche sono state arruolate per lo studio. È stata stabilita una dose fissa giornaliera di r-hFSH pari a 150 Unità Internazionali (*International Unit* - UI) per tutte le pazienti (Gonal-F®; Merck Serono S.p.A, Roma). Tale dose è stata mantenuta per 4 giorni. Il monitoraggio è stato effettuato mediante misurazione dei livelli sierici di E<sub>2</sub> (ai giorni 1, 5 e 8 di COS e al giorno della somministrazione di hCG) e mediante ecografie trans-vaginali (a giorni alterni a partire dal giorno 8 di stimolazione). Nelle pazienti con livelli di E<sub>2</sub> >180 pg/ml al 5° giorno di stimolazione la dose giornaliera di r-hFSH è stata ridotta a 112.5 UI. All'8ª giornata solo le pazienti che presentavano all'ecografia transvaginale almeno 6 follicoli fra i 6 ed i 10 mm di diametro, senza evidenza di follicoli con diametro >10 mm, hanno ricevuto un incremento della dose giornaliera di r-hFSH. In particolare, la dose è stata aumentata di 150 UI al giorno, per una dose cumulativa giornaliera di 300 UI. Le pazienti che hanno necessitato di variazioni di dose giornaliera come sopra riportato sono state escluse dallo studio. Sono state altresì escluse le pazienti che in fase di COS avanzata avevano mostrato un aumento del rischio di OHSS tale da richiedere cancellazione del ciclo. In presenza di almeno 3 follicoli con diametro medio di almeno 17 mm, l'ovulazione è stata indotta mediante 10000 UI di hCG (Gonasi®; IBSA Farmaceutici Italia SRL, Lodi). Il prelievo ovocitario è stato effettuato dopo 34 - 36 ore dalla somministrazione di hCG.

### *Campionamento ed analisi dei polimorfismi*

Per ogni paziente sono stati ottenuti 10 ml di sangue venoso mediante opportuno prelievo ematico e centrifugati a 400 giri per 10 minuti. Ciascun siero è stato separato, diviso in 4 aliquote e congelato. Alla stessa maniera, anche i *pellet* sono stati divisi in 4 aliquote e stoccati alla temperatura di -80° per poi essere successivamente analizzati.

E' stato utilizzata la piattaforma di sequenziamento "TruSeq Custom Amplicon v1,5, Illumina" per analizzare i seguenti polimorfismi:

- FSHR 307 (rs6165);
- FSHR 680 (rs6166);
- FSHR-29 (rs1394205);
- LHCGR 291 (rs12470652);
- LHCGR *intronic* (rs4073366);
- LHCGR 312 (rs2293275);
- FSHB 2623 (rs6169);
- v-LH (LHB) (rs1800447).

I *kit (assays)* per i geni LHB, FSHR, LHCGR e FSHB, progettati con Design Studio (Illumina, California, USA), consistevano in 44 ampliconi con una dimensione media di 250 bp e una regione *target* cumulativa di 5.7 kb. Il sequenziamento dei polimorfismi e la loro analisi quantitativa sono state effettuate tramite l'integrazione tra la piattaforma digitale MiSeq (Illumina, California, USA) e Variant Studio (Illumina, San Diego, USA). Il polimorfismo LHCGR 291 rs12470652, al contrario, è stato genotipizzato con il sequenziamento bidirezionale Sanger utilizzando BigDyeTerminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA; Eurofins Genomics, Ebersberg, Germania).

### *Endpoint primari e secondari*

L'*endpoint* primario dello studio è stato rappresentato dal rapporto fra il consumo totale di r-hFSH e il numero medio di ovociti recuperati.

Gli *endpoint* secondari sono stati rappresentati da:

- dose cumulativa di r-hFSH
- numero di giorni di stimolazione;
- livelli di E<sub>2</sub> il giorno dell'hCG;
- numero di follicoli preovulatori;
- numero di ovociti recuperati;
- numero di ovociti maturi (ovociti di Metafase II [*Metaphase II - MII*]);
- numero di ovociti inseminati;
- numero di ovociti fertilizzati;
- numero di ovociti congelati;
- numero di embrioni congelati;
- numero di embrioni trasferiti;
- *implantation rate*;
- PR per ciclo;
- PR per *transfer*;
- *ongoing* PR per ciclo;
- *ongoing* PR per *transfer*;
- *miscarriage rate*.

La dose cumulativa di r-hFSH utilizzato è stata considerata sia come valore assoluto sia dopo correzione per il numero totale di ovociti recuperati e numero di ovociti maturi.

### *Analisi statistica*

La frequenza genotipica degli SNPs e la loro distribuzione nella popolazione oggetto di studio è stata valutata mediante calcolo diretto ed il *linkage disequilibrium* valutato attraverso SNPStat.

L'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato eseguito mediante *test* Chi-Square, valutando la frequenza degli SNPs nelle pazienti arruolate comparata a quella della popolazione generale (Solé *et al.*, 2006). Sono stati creati modelli genetici di eredità in cui la frequenza allelica è stata confrontata con la frequenza nella popolazione generale. Così, in base alle frequenze del genotipo, sono stati generati quattro modelli: codominante, dominante, recessivo e sovradominante. La dominanza nella genetica è una relazione tra alleli di un gene, in cui l'effetto sul fenotipo di un allele maschera il contributo di un secondo allele allo stesso *locus*. La codominanza si verifica quando i contributi di entrambi gli alleli sono visibili nel fenotipo. È stato considerato "dominante" l'allele più frequente nella popolazione generale e sono stati generati quattro modelli a partire da queste osservazioni.

Il *test* Kolmogorov-Smirnov è stato utilizzato per valutare la distribuzione delle variabili. Le differenze nelle variabili continue tra gruppi sono state valutate con un modello univariato ANOVA per le variabili distribuite normalmente e con Kruskal-Wallis o Mann-Whitney per le variabili distribuite non normalmente. Il *test* Dunnett è stato utilizzato come *test post-hoc*. Il modello di regressione di Rho-Sperman è stato utilizzato per la correlazione bivariata.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il pacchetto statistico per il *software* di scienze sociali per Macintosh (SPSS Inc versione 20.0 USA, Chicago, IL).

### 3.2 Risultati

Nel presente studio sono state arruolate 94 pazienti sottoposte a cicli di Fecondazione *In Vitro* con Trasferimento dell'Embrione/Iniezione Intracitoplasmatica dello Spermatozoo (*Fertilization in Vitro and Embryo-Transfer/Intracytoplasmic Sperm Injection - FIVET/ICSI*) con un'età media di  $30.71 \pm 2.61$  anni e un BMI medio di  $22.9 \pm 2.35$  kg/m<sup>2</sup>.

La distribuzione genotipica degli SNPs era coerente con l'equilibrio Hardy-Weinberg e non sono state osservate differenze nel confronto delle frequenze alleliche nel gruppo di studio con la popolazione generale (Tabella 1).

Le caratteristiche basali della popolazione di studio sono riportate nella tabella 1.

**Tabella 1:** Caratteristiche basali della popolazione di studio

Caratteristiche basali	
Età (anni)	30.71±2.61
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.94±2.35
AMH (ng/mL)	2.70±1.76
AFC ( <i>n</i> )	12.36±3.63
FSH basale (UI/L)	6.73±1.98
E <sub>2</sub> basale (pg/mL)	80.65±101.16

Tutte le pazienti sono state trattate con 150 UI di r-hFSH al giorno e il dosaggio medio cumulativo di r-hFSH utilizzato è stato  $1725.33 \pm 520.15$  UI per una durata media di circa  $11.24 \pm 1.69$  giorni (Tabella 2). Solo due cicli (2.1%) sono stati interrotti per risposta eccessiva, mentre nessun ciclo è stato interrotto per mancata risposta.

Dopo la stimolazione, i livelli medi sierici di E<sub>2</sub> sono risultati pari a  $1655.43 \pm 895.59$  pg/mL. Le pazienti sono state sottoposte a FIVET nel 28.7% dei casi (27 pazienti) e ad ICSI nel 71.3% dei casi (67 pazienti).

Sono state accertate 40 gravidanze per ciclo (42.5%) mediante misurazione dei livelli sierici di  $\beta$ -hCG; 32 di queste (34.04%) sono state confermate anche con la valutazione ecografica (Tabella 2).

I dati continui sono espressi come media  $\pm$  deviazione *standard*, i dati categorici come percentuali.

Si è proceduto all'analisi degli *outcomes* del trattamento per ogni singolo polimorfismo considerato (Tabelle da 3 a 10).

**Tabella 2:** *Outcomes* del trattamento

<b><i>Outcomes</i> del trattamento</b>	
Dose totale di r-hFSH (UI)	1725.33 $\pm$ 520.15
Giorni di stimolazione ( <i>n</i> )	11.24 $\pm$ 1.69
E <sub>2</sub> il giorno dell'hCG (pg/mL)	1655.43 $\pm$ 895.59
Numero follicoli >10 mm ( <i>n</i> )	11.04 $\pm$ 4.41
Numero follicoli >16 mm ( <i>n</i> )	7.72 $\pm$ 3.15
Numero di ovociti recuperati ( <i>n</i> )	9.51 $\pm$ 3.82
Numero di ovociti maturi (MII) ( <i>n</i> )	7.78 $\pm$ 3.39
Ovociti inseminati ( <i>n</i> )	5.35 $\pm$ 3.50
Ovociti fertilizzati ( <i>n</i> )	3.61 $\pm$ 2.55
Ovociti congelati ( <i>n</i> )	0.35 $\pm$ 1.36
Embrioni congelati ( <i>n</i> )	6.73 $\pm$ 1.98
Embrioni trasferiti ( <i>n</i> )	1.65 $\pm$ 0.80
Cicli cancellati per risposta eccessiva ( <i>n</i> )	2 (2.1%)
Cicli cancellati per mancata risposta ( <i>n</i> )	0 (0%)
<i>Implantation rate</i> (%)	45.7
PR ( $\beta$ -hCG) per ciclo (%)	42.5
<i>Ongoing PR</i> per ciclo (%)	34.04
PR ( $\beta$ -hCG) per <i>transfer</i> (%)	30.5
<i>Ongoing PR</i> per <i>transfer</i> (%)	25.3
<i>Miscarriage rate</i> per ciclo (%)	9.4

### FSHR 307 (rs6165) and FSHR 680 (rs6166)

Per ciò che concerne la variante FSHR 307 (rs6165), il rapporto tra consumo totale di FSH e numero di ovociti recuperati è risultato significativamente differente tra i tre genotipi ( $p=0.050$ ), con un rapporto inferiore per il genotipo omozigote A/A rispetto al genotipo omozigote G/G e a quello eterozigote.

Per ciò che concerne la variante FSHR 680 (rs6166), il rapporto tra il consumo totale di FSH e il numero di ovociti recuperati è risultato significativamente inferiore per la variante omozigote A/A rispetto sia alla variante omozigote G/G ed eterozigote A/G ( $p=0.049$ ).

Nel complesso, non sono state riscontrate differenze in entrambi gli SNPs per quanto riguarda la dose totale di r-hFSH utilizzato e per tutti gli altri *outcomes* (Tabella 3 e 4).

**Tabella 3:** *Outcomes* del trattamento e stratificazione delle pazienti in base al polimorfismo FSHR 307 (rs6165)

	Omozigosi A/A	Eterozigosi A/G	Omozigosi G/G	<i>p</i> - value
Dose totale di r-hFSH (UI)	1781.23±568.45	1730.04±550.19	1647.17±383.58	0.536
FSH/ovociti	243.42±97.60	338.52±251.80	252.60±166.33	0.050
Giorni di stimolazione ( <i>n</i> )	11.13±1.68	11.35±1.82	11.10±1.41	0.769
Spessore endometriale (mm)	9.70±1.15	10.38±2.00	10.28±2.09	0.547
E <sub>2</sub> il giorno dell'hCG (pg/mL)	1555.24±663.85	1607.54±906.21	1859.42±1092.75	0.513
Follicoli ≥ 16mm il giorno dell'hCG ( <i>n</i> )	7.63±2.72	7.73±3.26	7.80±3.50	0.983
Ovociti prelevati ( <i>n</i> )	9.58±3.32	9.24±3.57	10.10±4.98	0.685
Ovociti maturi (MII) ( <i>n</i> )	8.13±2.72	7.50±3.71	8.06±3.47	0.643
Ovociti inseminati ( <i>n</i> )	6.08±3.26	5.18±3.60	4.90±3.55	0.346
Ovociti fertilizzati ( <i>n</i> )	3.92±2.53	3.60±2.66	3.25±2.38	0.537
Ovociti congelati ( <i>n</i> )	0.21±1.02	0.36±1.44	0.50±1.54	0.802
Embrioni congelati ( <i>n</i> )	0.96±1.81	1.16±2.05	0.65±1.31	0.534
Embrioni trasferiti ( <i>n</i> )	1.63±0.77	1.56±0.79	1.90±0.85	0.236
Implantation rate (%)	10/39	23/77	10/38	0.795
PR per transfer (%)	12/39	24/77	11/38	0.867
Ongoing PR per transfer (%)	9/39	21/77	9/38	0.792
PR per ciclo (%)	12/24	24/50	11/20	0.930
Ongoing PR per ciclo (%)	9/24	21/50	9/20	0.863

**Tabella 4:** *Outcomes* del trattamento e stratificazione delle pazienti in base al polimorfismo FSHR 680 (rs6166)

	<b>Omozigosi A/A</b>	<b>Eterozigosi A/G</b>	<b>Omozigosi G/G</b>	<b>p- value</b>
Dose totale di r-hFSH (UI)	1809.76±563.38	1725.25±554.53	1633.02±379.45	0.698
FSH/ovociti	248.80±96.34	333.44±250.88	252.60±166.33	0.049
Giorni di stimolazione (n)	11.42±1.72	11.23±1.81	11.50±1.40	0.804
Spessore endometriale (mm)	9.70±1.15	10.38±2.00	10.28±2.09	0.547
E <sub>2</sub> il giorno dell'hCG (pg/mL)	1624.09±722.40	1568.46±880.90	1859.42±1092.7 5	0.514
Follicoli ≥ 16mm il giorno dell'hCG (n)	7.58±2.70	7.71±3.28	7.90±3.45	0.944
Ovociti prelevati (n)	9.67±3.33	9.20±3.59	10.05±4.86	0.697
Ovociti maturi (MII) (n)	8.22±2.78	7.45±3.67	8.06±3.47	0.725
Ovociti inseminati (n)	6.21±3.35	5.18±3.55	4.76±3.52	0.476
Ovociti fertilizzati (n)	4.04±2.56	3.57±2.65	3.19±2.38	0.694
Ovociti congelati (n)	0.21±1.02	0.37±1.45	0.48±1.50	0.779
Embrioni congelati (n)	1.00±1.82	1.16±2.06	0.62±1.28	0.581
Embrioni trasferiti (n)	1.63±0.77	1.55±0.79	1.90±0.83	0.273
Implantation rate (%)	10/37	21/77	12/40	0.844
PR per transfer (%)	12/37	22/77	13/40	0.839
Ongoing PR per transfer (%)	9/37	19/77	11/40	0.848
PR per ciclo (%)	12/23	23/50	13/21	0.812
Ongoing PR per ciclo (%)	9/23	19/50	11/21	0.867

*FSHR-29 (rs1394205)*

Per ciò che concerne l'analisi del polimorfismo FSHR -29 (rs1394205), non sono state riscontrate differenze significative per i singoli *outcomes* tra i modelli generati secondo la frequenza dei genotipi (Tabella 5).

**Tabella 5:** *Outcomes* del trattamento e stratificazione delle pazienti in base al polimorfismo FSHR-29 (rs1394205)

	Omozigosi G/G	Eterozigosi G/A	Omozigosi A/A	<i>p-value</i>
Dose totale di r-hFSH (UI)	1730.04±554.55	1745.19±476.55	1601.71±487.46	0.804
FSH/ovociti	322.78±239.49	229.73±109.79	312.83±161.03	0.186
Giorni di stimolazione ( <i>n</i> )	11.20±1.52	11.39±1.87	11.50±1.40	0.733
Spessore endometriale (mm)	10.29±2.00	9.91±1.55	10.47±1.36	0.776
E <sub>2</sub> il giorno dell'hCG (pg/mL)	1518.52±742.11	1832.04±1184.50	2039.14±706.30	0.197
Follicoli ≥ 16mm il giorno dell'hCG ( <i>n</i> )	8.07±3.23	6.90±2.83	8.50±3.50	0.197
Ovociti prelevati ( <i>n</i> )	9.60±3.90	9.58±3.84	8.63±3.54	0.794
Ovociti maturi (MII) ( <i>n</i> )	7.67±3.65	8.46±2.90	6.50±2.83	0.344
Ovociti inseminati ( <i>n</i> )	5.22±3.49	5.90±3.67	4.13±2.70	0.404
Ovociti fertilizzati ( <i>n</i> )	3.47±2.67	3.97±2.60	3.13±1.36	0.595
Ovociti congelati ( <i>n</i> )	0.38±1.38	0.19±1.08	0.75±2.12	0.572
Embrioni congelati ( <i>n</i> )	1.05±2.03	1.03±1.72	0.50±0.76	0.730
Embrioni trasferiti ( <i>n</i> )	1.62±0.85	1.61±0.76	2.0±0.53	0.435
<i>Implantation rate</i> (%)	18/88	21/50	4/16	0.934
PR per <i>transfer</i> (%)	22/88	21/50	4/16	0.754
<i>Ongoing PR per transfer</i> (%)	16/88	19/50	4/16	0.770
PR per ciclo (%)	22/55	21/31	4/8	0.879
<i>Ongoing PR per ciclo</i> (%)	16/55	19/31	4/8	0.435

### LHCGR 291 (rs12470652)

Le pazienti eterozigoti per tale variante hanno mostrato livelli di E<sub>2</sub> più elevati al giorno della somministrazione di hCG ( $p=0.005$ ) rispetto alle pazienti portatrici del genotipo *wild-type* (Tabella 6). Analogamente, nel genotipo eterozigote sono stati riscontrati un numero maggiore di ovociti totali recuperati ( $p=0.035$ ), ovociti MII ( $p=0.002$ ), ovociti inseminati ( $p=0.001$ ), ovociti fertilizzati ( $p=0.001$ ) ed embrioni congelati ( $p=0.001$ ) rispetto al genotipo *wild-type*. Non sono state riscontrate differenze significative tra le altre variabili (tabella 6).

**Tabella 6:** *Outcomes* del trattamento e stratificazione delle pazienti in base al polimorfismo LHCGR 291 (rs12470652)

	Omozigosi T/T	Eterozigosi C/T	<i>p-value</i>
Dosi totali di r-hFSH (UI)	1736.38±534.53	1568.75±196.17	0.449
FSH/ovociti	305.86±208.66	147.65±46.77	0.069
Giorni di stimolazione ( <i>n</i> )	11.21±1.70	11.57±1.62	0.588
Spessore endometriale (mm)	9.97±1.49	11.04±2.76	0.146
E <sub>2</sub> al giorno dell'hCG (pg/mL)	1580.60±860.03	2733.00±747.23	0.005
Follicoli ≥ 16mm il giorno dell'hCG ( <i>n</i> )	7.80±3.16	6.71±2.98	0.382
Ovociti prelevati ( <i>n</i> )	9.28±3.81	12.43±2.82	0.035
Ovociti maturi (MII) ( <i>n</i> )	7.45±3.21	11.43±3.41	0.002
Ovociti inseminati ( <i>n</i> )	4.92±3.20	10.71±2.56	0.001
Ovociti fertilizzati ( <i>n</i> )	3.24±2.16	8.14±2.91	0.001
Ovociti congelati ( <i>n</i> )	0.38±1.41	0.00±0.00	0.480
Embrioni congelati ( <i>n</i> )	0.75±1.47	4.14±3.08	0.001
Embrioni trasferiti ( <i>n</i> )	1.68±0.81	1.29±0.49	0.213
<i>Implantation rate</i> (%)	41/145	2/9	0.992
PR per <i>transfer</i> (%)	45/145	4/9	0.639
<i>Ongoing PR per transfer</i> (%)	37/145	2/9	0.861
PR per ciclo (%)	45/87	4/7	0.907
<i>Ongoing PR per ciclo</i> (%)	37/87	2/7	0.747

LHCGR intronic (rs4073366), LHCGR 312 (rs2293275), FSHB 2623 (rs6169) and LHB (rs1800447)

Non sono state riscontrate differenze significative per tutti i parametri considerando LHCGR intronic (rs4073366), LHCGR 312 (rs2293275), FSHB 2623 (rs6169) e LHB rs1800447 (Tabelle 7 - 10).

**Tabella 7:** Outcomes del trattamento e stratificazione delle pazienti in base al polimorfismo LHCGR intronic (rs4073366)

	Omozigosi C/C	Eterozigosi C/G	Omozigosi G/G	<i>p</i> - value
Dosi totali di r-hFSH (UI)	1751.42±565.69	1661.43±441.10	1800.00±150.00	0.732
FSH/ovociti	300.74±215.01	286.65±194.49	214.29±90.91	0.826
Giorni di stimolazione ( <i>n</i> )	11.18±1.63	11.29±1.88	12.00±1.00	0.705
Spessore endometriale (mm)	9.93±1.54	10.46±2.12	11.05±2.76	0.525
E <sub>2</sub> il giorno dell'hCG (pg/mL)	1555.90±765.64	1876.68±1112.63	1200.00±1000.0	0.303
Follicoli ≥ 16mm il giorno dell'hCG ( <i>n</i> )	7.82±2.93	7.36±3.71	9.00±1.73	0.632
Ovociti prelevati ( <i>n</i> )	9.56±4.10	9.38±3.41	9.67±2.31	0.975
Ovociti maturi (MII) ( <i>n</i> )	7.74±3.40	7.78±3.49	9.00±2.83	0.878
Ovociti inseminati ( <i>n</i> )	5.24±3.49	5.41±3.56	7.00±4.00	0.696
Ovociti inseminati ( <i>n</i> )	3.60±2.61	3.38±2.14	6.00±4.58	0.241
Ovociti congelati ( <i>n</i> )	0.35±1.37	0.38±1.42	0.00±0.00	0.901
Embrioni congelati ( <i>n</i> )	0.95±1.81	1.10±2.01	1.00±1.73	0.937
Embrioni trasferiti ( <i>n</i> )	1.69±0.84	1.59±0.73	1.33±0.58	0.662
Implantation rate (%)	32/104	10/46	1/4	0.348
PR per transfer (%)	33/104	13/46	1/4	0.816
Ongoing PR per transfer (%)	29/104	9/46	1/4	0.381
PR per ciclo (%)	33/62	13/29	1/3	0.563
Ongoing PR per ciclo (%)	29/104	9/29	1/3	0.656

**Tabella 8:** *Outcomes* del trattamento e stratificazione delle pazienti in base al polimorfismo LHCGR 312 (rs2293275)

	Omozigosi T/T	Eterozigosi T/C	Omozigosi C/C	<i>p-value</i>
Dosi totali di r-hFSH (UI)	1807.00±667.15	1703.23±451.24	1713.54±533.65	0.788
FSH/ovociti	322.28±169.80	241.81±164.53	329.30±246.56	0.195
Giorni di stimolazione ( <i>n</i> )	11.18±1.78	11.29±1.68	11.20±1.71	0.960
Spessore endometriale (mm)	10.08±2.73	10.08±1.46	10.32±1.49	0.925
E <sub>2</sub> il giorno dell'hCG (pg/mL)	1773.50±645.43	1731.31±1104.56	1523.77±748.41	0.571
Follicoli ≥ 16mm il giorno dell'hCG ( <i>n</i> )	7.12±3.43	7.24±2.75	8.57±3.35	0.127
Ovociti prelevati ( <i>n</i> )	8.47±2.98	9.86±4.11	9.60±3.84	0.449
Ovociti maturi (MII) ( <i>n</i> )	7.29±3.60	8.72±3.29	7.15±3.27	0.136
Ovociti inseminati ( <i>n</i> )	5.53±3.52	5.93±3.87	4.57±2.91	0.233
Ovociti fertilizzati ( <i>n</i> )	3.29±2.52	4.05±3.10	3.23±1.68	0.324
Ovociti congelati ( <i>n</i> )	0.00±0.00	0.14±0.93	0.77±1.93	0.063
Embrioni congelati ( <i>n</i> )	1.24±2.11	1.10±2.02	0.77±1.50	0.636
Embrioni trasferiti ( <i>n</i> )	1.41±0.87	1.55±0.67	1.89±0.87	0.071
<i>Implantation rate</i> (%)	4/23	16/65	23/66	0.192
<i>PR per transfer</i> (%)	5/24	19/65	23/66	0.311
<i>Ongoing PR per transfer</i> (%)	3/24	15/65	21/66	0.118
<i>PR per ciclo</i> (%)	5/17	19/42	23/35	0.408
<i>Ongoing PR per ciclo</i> (%)	3/17	15/42	21/35	0.292

**Tabella 9:** *Outcomes* del trattamento e stratificazione delle pazienti in base al polimorfismo FSHB 2623 (rs6169)

	Omozigosi T/T	Eterozigosi T/C	Omozigosi C/C	<i>p-value</i>
Dosi totali di r-hFSH (UI)	1777.94±510.79	1677.91±513.57	1782.50±550.64	0.648
FSH/ovociti	300.14±310.68	287.17±175.63	301.22±179.14	0.958
Giorni di stimolazione ( <i>n</i> )	10.88±1.41	11.12±1.45	11.69±2.03	0.240
Spessore endometriale (mm)	10.30±0.91	9.97±1.77	10.31±2.06	0.844
E <sub>2</sub> il giorno dell'hCG (pg/mL)	1085.42±679.11	1679.86±789.85	1929.95±895.59	0.300
Follicoli ≥ 16mm il giorno dell'hCG ( <i>n</i> )	8.29±3.51	7.72±2.96	7.35±3.32	0.633
Ovociti prelevati ( <i>n</i> )	10.24±4.26	9.16±3.58	9.73±4.04	0.572
Ovociti maturi (MII) ( <i>n</i> )	8.53±3.52	7.55±3.23	7.73±3.63	0.629
Ovociti inseminati ( <i>n</i> )	5.88±4.06	4.80±3.12	6.08±3.75	0.254
Ovociti fertilizzati ( <i>n</i> )	4.24±3.03	3.27±2.23	3.85±2.81	0.350
Ovociti congelati ( <i>n</i> )	0.29±1.21	0.22±1.08	0.65±1.85	0.405
Embrioni congelati ( <i>n</i> )	1.53±2.24	0.67±1.27	1.31±2.40	0.152
Embrioni trasferiti ( <i>n</i> )	1.71±0.92	1.67±0.82	1.58±0.70	0.854
<i>Implantation rate</i> (%)	12/29	19/84	12/41	0.922
<i>PR per transfer</i> (%)	12/29	21/84	14/41	0.933
<i>Ongoing PR per transfer</i> (%)	10/29	17/84	12/41	0.821
<i>PR per ciclo</i> (%)	12/17	21/51	14/26	0.436
<i>Ongoing PR per ciclo</i> (%)	10/17	17/51	12/26	0.617

**Tabella 10:** *Outcomes* del trattamento e stratificazione delle pazienti in base al polimorfismo LHB (rs1800447)

	<b>Omozigosi T/T</b>	<b>Eterozigosi T/C</b>	<b><i>p-value</i></b>
Dosi totali di r-hFSH (UI)	1766.44±557.28	1579.37±329.68	0.157
FSH/ovociti	301.90±214.61	266.76±171.73	0.526
Giorni di stimolazione ( <i>n</i> )	11.37±1.78	10.75±1.21	0.147
Spessore endometriale (mm)	10.24±1.43	9.84±2.75	0.563
E2 il giorno dell'hCG (pg/mL)	1586.26±860.00	1941.33±1011.35	0.170
Follicoli ≥ 16mm il giorno dell'hCG ( <i>n</i> )	7.47±3.02	8.65±3.51	0.137
Ovociti prelevati ( <i>n</i> )	9.41±3.61	9.90±4.62	0.610
Ovociti maturi (MII) ( <i>n</i> )	7.69±3.21	8.11±4.07	0.646
Ovociti inseminati ( <i>n</i> )	5.30±3.17	5.55±4.59	0.776
Ovociti fertilizzati ( <i>n</i> )	3.47±2.33	4.10±3.27	0.333
Ovociti congelati ( <i>n</i> )	0.22±1.06	0.85±2.08	0.064
Embrioni congelati ( <i>n</i> )	0.81±1.59	1.70±2.51	0.056
Embrioni trasferiti ( <i>n</i> )	1.69±0.86	1.50±0.51	0.350
<i>Implantation rate</i> (%)	35/126	8/28	0.822
PR per <i>transfer</i> (%)	36/126	11/28	0.375
<i>Ongoing PR</i> per <i>transfer</i> (%)	32/126	7/28	0.844
PR per ciclo (%)	36/75	11/19	0.607
<i>Ongoing PR</i> per ciclo (%)	32/75	7/19	0.842

### Analisi multivariata

La considerazione complessiva degli otto SNPs valutati nello studio ha mostrato che la co-presenza dell'allele G del FSHR-29 (rs1394205) e dell'allele C del LHCGR 291 (rs12470652) è risultata correlata ad un aumento del rapporto tra dose cumulativa di r-hFSH e numero totale di ovociti recuperati (5.47, CI 95%: 3.13 - 7.82,  $p < 0.0001$ ) (Tabella 11). Analogamente, la presenza congiunta dell'allele G sia del FSHR-29 (rs1394205) sia del FSHR 680 (rs6166) e dell'allele C del LHCGR 291 (rs12470652) è risultata correlata ad un aumento del rapporto tra dose cumulativa di r-hFSH e numero totale di ovociti recuperati (5.44, CI 95%: 3.18 - 7.71,  $p < 0.0001$ ).

**Tabella 11.** Analisi allelica multivariata

Analisi allelica multivariata					
	FSHR 29	LHCGR 291	Frequenza	Differenza (CI 95%)	<i>p</i> - value
1	C	T	0.7287	0.00	---
2	T	T	0.2412	0.26 (-0.5 - 1.02)	0.5
3	G	C	0.0243	5.47 (3.13 - 7.82)	<0.0001
rare	*	*	0.0058	1.23 (-4.03 - 6.5)	0.65
Valutazione globale dei polimorfismi: <i>p</i> -value 0.6					

Analisi allelica multivariata						
	FSHR 680	FSHR 29	LHCGR 291	Frequenza	Differenza (CI 95%)	<i>p</i> - value
1	C	C	T	0.3739	0.00	---
2	T	C	T	0.3556	-0.5 (1.43 - 0.42)	0.29
3	T	T	T	0.1498	0.08 (-0.96 - 1.12)	0.88
4	C	T	T	0.0905	0.07 (-1.16 - 1.3)	0.91
5	G	G	C	0.0235	5.44 (3.18 - 7.71)	<0.0001
rare	*	*	*	0.0066	1.36 (-3.65 - 6.37)	0.6
Valutazione globale dei polimorfismi: <i>p</i> -value 0.6						

### 3.3 Discussione

I dati del presente studio supportano le evidenze riguardanti l'impatto delle variabili genetiche sulla risposta ovarica nell'ambito dei cicli di PMA. Più in particolare, dall'analisi dei risultati dello studio emerge come la presenza di specifici polimorfismi in pazienti sottoposte a protocolli di stimolazione ovarica *standard* si associ a un incremento significativo del consumo di r-hFSH in relazione al numero di ovociti ottenuti. Tale evidenza si riscontra nelle pazienti portatrici del polimorfismo FSHR 307 (rs6165) e del polimorfismo FSHR 608 (rs6166); in entrambi i casi, infatti, il rapporto tra il consumo totale di r-hFSH e il numero degli ovociti recuperati appare significativamente inferiore per le pazienti portatrici della variante omozigote A/A. Analogamente, anche la presenza del LHCGR 291 (rs12470652) sembrerebbe influenzare di per sé gli *outcomes* della stimolazione ovarica, con particolare riferimento al genotipo eterozigote in cui si riscontrano un significativo incremento del numero degli ovociti recuperati, ovociti MII, ovociti inseminati, ovociti fertilizzati ed embrioni congelati. Dai dati ottenuti emerge inoltre che la co-presenza dell'allele G del FSHR-29 (rs1394205) e dell'allele C del LHCGR 291 (rs12470652) è correlata ad un aumento del rapporto tra dose cumulativa di r-hFSH e numero totale degli ovociti recuperati. Un'analogha evidenza emerge infine nel caso della presenza congiunta dell'allele G sia del FSHR-29 (rs1394205) sia del FSHR680 (rs6166) e dell'allele C del LHCGR 291 (rs12470652). Tali dati supportano l'ipotesi che anche l'interazione di specifici tratti genetici possa influenzare la sensibilità ovarica alle gonadotropine esogene con ricaduta sul numero assoluto degli ovociti ottenuti.

I dati del presente studio presentano come punti di forza il disegno prospettico e la valutazione combinata di alcuni polimorfismi, tuttavia non possono non essere considerati alcuni limiti. In particolare, vanno sottolineati la dimensione campionaria esigua e l'estensione del *follow up* soltanto alle fasi precocissime della gravidanza. E' importante a tal proposito sottolineare che il disegno sperimentale dello studio è stato finalizzato ad una valutazione preliminare dell'impatto dei polimorfismi medesimi sugli *outcome* della COS, laddove indagini relative ad una loro potenziale ricaduta sulle variabili gestazionali avrebbe richiesto una dimensione campionaria molto più ampia.

Si ritiene infatti che parametri quali il numero di ovociti recuperati ed il consumo totale di gonadotropine rappresentino indicatori più reali dell'impatto delle varianti geniche quando paragonati a variabili relative alla gravidanza e all'evento "nascita", maggiormente influenzati dall'età materna, dalla qualità embrionaria e da eventi che si manifestano solo nelle fasi successive del percorso gestazionale.

Per ciò che concerne l'analisi delle specifiche varianti geniche, è opportuno sottolineare che l'evidenza circa l'impatto del polimorfismo LHCGR 291 (rs12470652) sulla risposta alla stimolazione ovarica e sui tassi di fertilizzazione rappresenta allo stato attuale un punto di partenza per approfondimenti successivi. La bassa frequenza allelica C del polimorfismo LHCGR 291 (rs12470652), infatti, pone dei limiti interpretativi ai risultati riportati in maniera preliminare dal presente studio.

A differenza dei risultati emersi da altri studi in letteratura (Čuš *et al.*, 2019), dai dati del presente studio non emerge che il polimorfismo FSHR-29 da solo sia associato a un'alterata risposta ovarica. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta alle differenze nel disegno dello studio e nella stratificazione delle pazienti arruolate, nei criteri di inclusione e nei protocolli utilizzati. La popolazione di studio nel presente lavoro, infatti, risponde a stretti criteri di inclusione ed è stata prospetticamente analizzata con una stimolazione standardizzata con gonadotropine e con una dose iniziale fissa (Čuš *et al.*, 2019).

I risultati relativi ai polimorfismi dell'FSHR (rs6166 e rs6165) sono coerenti con gli studi precedenti (Perez Mayorga *et al.*, 2000; De Castro *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2013; Alviggi *et al.*, 2016a; Alviggi *et al.*, 2018a; Garcia-Jimenez *et al.*, 2018) che hanno dimostrato una resistenza nelle portatrici della variante allelica GG all'FSH sia endogeno che esogeno. Questa resistenza sembra essere correlata a specifiche caratteristiche molecolari. In particolare, studi *in vitro* condotti su cellule di granulosa umana hanno mostrato che *carriers* della variante GG del FSHR (rs6166) hanno una maggiore resistenza all'FSH (Casarini *et al.*, 2014; Casarini *et al.*, 2015). Al contrario, la presenza dell'allele AA conferirebbe una maggiore sensibilità all'FSH esogeno, come dimostrato da un recente studio

retrospettivo eseguito su 586 pazienti candidate a PMA da cui emerge come le portatrici di tale variante allelica siano maggiormente a rischio di sviluppare OHSS (Nenonen *et al.*, 2019).

A differenza della letteratura precedente (Alviggi *et al.*, 2009b; Alviggi *et al.*, 2013) nel presente studio non è stata osservata un'associazione tra la risposta ovarica e il comune polimorfismo beta dell'LH (rs1800447). Questa incongruenza potrebbe tuttavia essere spiegata con l'assenza di portatrici omozigoti per tale variante e con la dimensione limitata del campione (94 pazienti contro i 200 casi riportati nel 2013) (Alviggi *et al.*, 2013). Inoltre, il diverso disegno dello studio potrebbe spiegare la discrepanza.

E' importante sottolineare che, a differenza dei dati presenti in letteratura ad oggi, nel presente lavoro è stata eseguita un'analisi multivariata per stabilire se anche le interazioni tra i diversi polimorfismi possano influenzare la risposta ovarica. La maggior parte degli studi precedenti infatti si è concentrata su un singolo polimorfismo (De Castro *et al.*, 2003; Achrekar *et al.*, 2009; Jun *et al.*, 2006; Genro *et al.*, 2012; Lazaros *et al.*, 2012) e quelli più recenti hanno considerato non più di due polimorfismi insieme (Desai *et al.*, 2013; Lindgren *et al.*, 2016).

I dati del presente studio confermano l'esistenza di una sottocategoria di pazienti che, a fronte di parametri di riserva ovarica nella norma, necessitano di dosi maggiori di r-hFSH ai fini dell'ottenimento di un adeguato numero di ovociti. Il numero di ovociti recuperati, infatti, rappresenta l'indicatore più sensibile nel successo delle tecniche di PMA, dal momento che è strettamente e proporzionalmente legato al LBR (Sunkara *et al.*, 2011).

Nell'ambito delle strategie volte all'ottimizzazione della risposta alle gonadotropine esogene, diversi studi hanno esaminato l'utilità clinica dell'aggiunta di r-hLH in donne con resistenza ovarica (Lisi *et al.* 2002; Alviggi *et al.*, 2006). I dati provenienti dagli studi più robusti indicano che nella sottocategoria di pazienti con "risposta lenta", l'integrazione con r-hLH a partire dalla fase follicolare tardiva possa essere maggiormente efficace rispetto all'aumento della dose di r-hFSH (De Placido *et al.*, 2005; Yilmaz *et al.*, 2015). I risultati di tali studi meritano tuttavia di essere interpretati con cautela poiché in tutti i casi è stato utilizzato un protocollo lungo con GnRH-a e

attualmente non esistono sufficienti dati riguardanti l'uso della supplementazione con r-hLH per le *hypo-responders* in protocolli che hanno optato per un regime con GnRH-ant.

I meccanismi molecolari che sottendono l'effetto benefico dell'r-hLH nelle *hypo-responders* non è tuttavia ancora ben chiaro. Sebbene sia stato suggerito che l'eccessiva soppressione dell'LH endogeno dopo la *down-regulation* con GnRH-a possa creare la necessità di un'integrazione di LH esogeno, gli studi presenti in letteratura non hanno evidenziato una chiara e significativa associazione fra i livelli plasmatici dell'LH durante i cicli di COS e la risposta all'integrazione con r-hLH (Ferraretti *et al.*, 2004; De Placido *et al.*, 2005; Pezzuto *et al.*, 2010). Un'ipotesi più plausibile sarebbe legata a caratteristiche geneticamente determinate dell'LH stesso o dei suoi recettori. Alviggi *et al.* (Alviggi *et al.*, 2013; Alviggi *et al.*, 2009a) hanno infatti dimostrato che pazienti portatrici della variante della catena beta dell'LH mostravano resistenza ovarica alle gonadotropine esogene, richiedendo, pertanto, un dosaggio maggiore di r-hFSH durante i cicli di COS. I risultati di un'ulteriore metanalisi suggeriscono che la supplementazione con r-hLH possa effettivamente essere benefica nelle pazienti normogonadotrope e con un'inaspettata "ipo-risposta" all'r-hFSH (Conforti *et al.*, 2019a). Possiamo pertanto ipotizzare che l'aggiunta di r-hLH alle pazienti che nel presente studio hanno richiesto dosi maggiori di r-hFSH possa rappresentare una strategia alternativa di trattamento farmacologico.

In conclusione, tale studio dimostra che la presenza di polimorfismi specifici possa influenzare la risposta alla stimolazione ovarica e che l'analisi simultanea di polimorfismi multipli possa fornire informazioni utili sulla sensibilità ovarica alle gonadotropine esogene nei cicli di COS. Tali dati necessitano tuttavia di conferma in studi più ampi. Infine è importante sottolineare che sono state arruolate pazienti sottoposte esclusivamente ad un protocollo lungo con analogo, pertanto mancano dati che forniscano evidenze circa l'approccio con antagonisti.

Analizzare le caratteristiche genetiche delle gonadotropine e dei loro recettori con un approccio di tipo farmacogenomico potrebbe rappresentare uno strumento importante al fine di ottimizzare le tecniche di PMA attraverso una maggiore personalizzazione dei trattamenti. L'identificazione *a*

*priori* di tali polimorfismi potrebbe infatti riflettersi in un maggiore adeguamento della scelta terapeutica alle esigenze specifiche delle pazienti. Questo risulterebbe vantaggioso non solo per gli operatori sanitari al fine di evitare dosaggi eccessivi quando non richiesti o sottodosaggi in pazienti apparentemente a buona prognosi, sia per le pazienti che vedrebbero ridotti i tempi e lo *stress* della stimolazione stessa.

Idealmente gli studi farmacogenetici e farmacogenomici potrebbero condurre ad un'epoca in cui la sequenza di DNA di un individuo sarà considerata un fattore determinante per la terapia farmacologica. Più nello specifico, qualora i risultati di tali ricerche venissero avvalorati da un corpo maggiore di evidenze, potrebbe rendersi utile l'inserimento nel *work up* diagnostico terapeutico della PMA di *test* atti ad una identificazione precoce di tali varianti geniche che, combinate con i più classici parametri demografici ed antropometrici (età, peso, AFC, AMH, FSH basale) consentirebbero di ottimizzare i trattamenti attraverso un bilanciamento fra efficacia (aumento del *clinical* LBR) ed efficienza (decremento del tasso di OHSS, gravidanze multiple, cancellazioni dei cicli) in un'ottica di riduzione del *time to pregnancy*. L'adozione relativamente lenta di protocolli di tipo farmacogenomico, in tal senso, è il risultato di differenti fattori, tra cui il costo dei *test* genetici, la necessità di attrezzature di laboratorio specifiche, la mancanza di robuste evidenze circa l'utilità stessa dei *test* ed una non adeguata conoscenza della farmacogenomica tra gli operatori sanitari. Tuttavia, nell'era attuale, in cui sono stati sviluppati i primi strumenti diagnostici genomici nella medicina della riproduzione (Altmäe e Salumets, 2011b), c'è l'opportunità di rendere i protocolli di stimolazione ovarica individualizzati una realtà concreta. Infine, tali studi potrebbero fare luce su alcune anomalie disfunzionali dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade, considerate come manifestazioni di sterilità idiopatica, i cui connotati eziopatogenetici risultano ancora poco chiari.

## **2ª SEZIONE SPERIMENTALE**

### **4. L'ottimizzazione della resa ovarica attraverso le onde follicolari multiple: applicazione clinica dell'approccio Duostim**

#### **Basi di partenza scientifica**

Le recenti acquisizioni scientifiche sulla dinamica ovarica e, più in particolare, sui delicati e complessi meccanismi di follicologenesi regolati dall'asse ipotalamo-ipofisario, hanno aperto interessanti scenari circa la possibilità, per le pazienti a bassa prognosi, di ottimizzare il proprio *outcome* riproduttivo.

Per molti decenni, l'orientamento clinico ha basato il proprio approccio sperimentale sull'assunto che, nell'ambito del ciclo mestruale, si verifichi un singolo fenomeno di reclutamento follicolare (Pache *et al.*, 1990; de Mello *et al.*, 2010), nonostante evidenze ecografiche rilevassero un numero limitato di follicoli non atresici con attività steroidogenica anche nella fase luteale (McNatty *et al.*, 1983). Più nello specifico, la teoria tradizionale della follicologenesi umana, sviluppata negli ultimi 50 anni, ha sostenuto per lungo tempo che una singola coorte di 3-11 follicoli antrali venga reclutata per crescere in ogni ovaio durante la tarda fase luteale (Pache *et al.*, 1990). Si ritiene che, all'interno di questa coorte e dall'inizio della fase follicolare, un singolo follicolo sia selezionato per continuare a crescere e successivamente ovulare attraverso il controllo diretto da parte dell'asse ipotalamo-ipofisi (Hodgen, 1982; Goodman and Hodgen, 1983; Gougeon, 1986). Lo sviluppo follicolare fino all'ovulazione è stato a lungo ritenuto essere appannaggio della sola fase follicolare (Gougeon, 1993; Pellicer *et al.*, 1998; McGee and Hsueh, 2000); la fase luteale, al contrario, è stata associata ad uno stato di quiescenza a causa degli effetti esercitati dal progesterone del corpo luteo, fino a quel momento ritenuti esclusivamente di tipo inibitorio sui centri nervosi superiori (Baird and Fraser, 1975; McNatty *et al.*, 1983; Chikazawa *et al.*, 1986; Tonetta and Zerega, 1989; Check *et al.*, 1991; Zeleznik, 2001).

Di recente, tuttavia, la teoria del reclutamento follicolare singolo è stata messa in dubbio dall'ipotesi che, durante lo stesso ciclo mestruale, coorti omogenee di follicoli antrali ("onde", dall'inglese

waves) crescano simultaneamente a intervalli regolari (Baerwald *et al.*, 2012) sotto l'effetto degli stimoli neuroendocrini mediati dall'asse ipotalamo-ipofisario. Più in particolare, si identifica "un'onda follicolare" come la crescita sincrona di un gruppo di follicoli antrali, verificatasi a intervalli regolari durante il ciclo mestruale. Tale ipotesi, inizialmente osservata in studi su modelli animali (Ginther *et al.*, 1989; Ginther *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2009; Adams *et al.*, 2012), è stata confermata anche nell'uomo portando alla definizione di due teorie sul reclutamento follicolare (Baerwald *et al.*, 2012): la *teoria del reclutamento continuo*, secondo cui i follicoli inizierebbero a crescere e regredirebbero continuamente durante il ciclo ovarico e la *teoria delle "onde follicolari"*, che basa il suo principio sull'ipotesi che fino a 3 coorti di follicoli antrali in ogni ciclo sarebbero reclutate per completare la follicologenesi. I meccanismi di regolazione neuroendocrina e molecolare alla base del reclutamento follicolare, tuttavia, non sono stati ancora completamente chiariti pur identificando nell'asse ipotalamo-ipofisi il principale sistema regolatore.

A conferma di quanto appena accennato, nel 2003, basandosi su studi ultrasonografici, Baerwald *et al.* osservarono, in particolare, come fino a 2-3 onde follicolari si manifestassero durante il periodo intraovulatorio di donne sane. Fu pertanto suggerito che i follicoli sviluppatasi durante la fase luteale, esprimendo recettori per l'FSH, risultassero in grado di rispondere all'attività stimolatoria delle gonadotropine endogene, rappresentando unità potenzialmente reclutabili perché in grado di ovulare in presenza di LH (Baerwald *et al.*, 2003a; Baerwald *et al.*, 2003b). Tali ipotesi si allineavano con precedenti studi animali effettuati *in vivo* e basati sulla raccolta di ovociti dalle bovine. Tali prelievi venivano effettuati in presenza del corpo luteo, che in questa specie animale copre gran parte del ciclo estrale (Pieterse *et al.*, 1988; Galli *et al.*, 2001). Gli studi confermarono come anche nella fase luteale i follicoli fossero sensibili alle gonadotropine esogene (in particolare, sotto stimolo se ne osservava un incremento delle dimensioni); si osservò inoltre che, se il corpo luteo veniva lissato attraverso la somministrazione di prostaglandine, l'ovulazione e la fecondazione degli ovociti avvenivano normalmente (Pieterse *et al.*, 1988; Pieterse *et al.*, 1991).

Ulteriori studi effettuati più recentemente su animali, inoltre, hanno suggerito come la presenza del corpo luteo sembrerebbe in grado di modulare l'effetto delle gonadotropine. Nelle pecore, ad esempio, è stato ipotizzato che il progesterone possa fungere da segnale endocrino in grado di modulare le fluttuazioni di FSH nel siero e il numero di onde follicolari per ciclo. Più nello specifico, non è stato tuttavia ben chiarito se il progesterone eserciti un'azione locale o sistemica (mediata in questo caso da cambiamenti nella secrezione di FSH e LH) sulla durata del follicolo antrale. È stato ipotizzato pertanto che, sotto l'influenza del progesterone luteale, la sensibilità delle cellule ipofisarie al GnRH ipotalamico possa aumentare, con conseguente maggiore secrezione di FSH e dunque maggiore stimolo sulle unità follicolari. In tal senso, il progesterone luteale risulterebbe in grado di modulare il tasso di *clearance* dell'FSH circolante (Bartlewski *et al.*, 2011). L'acquisizione di tali evidenze ha aperto dunque interessanti ipotesi e innovativi scenari clinici circa la possibilità di ottimizzare i protocolli di COS. Modulando l'utilizzo delle gonadotropine e degli analoghi del GnRH, ci si è chiesti come sfruttare le onde follicolari e secondo quali modalità influenzare l'asse neuroendocrino al fine di ottimizzare la resa ovarica. La presenza di recettori per l'FSH e la responsività degli stessi alle gonadotropine esogene, anche nella fase luteale, lascerebbe ipotizzare la possibilità di approcciare alla stimolazione ovarica in qualsiasi momento del ciclo mestruale. L'utilizzo degli analoghi del GnRH, antagonisti e agonisti, consentirebbero inoltre, rispettivamente, di inibire i picchi prematuri di LH e di indurre la maturazione ovocitaria mediante effetto *flare-up* sulla ghiandola ipofisaria.

L'integrazione delle conoscenze di fisiologia ovarica con il modello scientifico dell'asse ipotalamo-ipofisi hanno condotto, pertanto, alla definizione di un approccio di tipo "combinato", concepito come possibile strategia di ottimizzazione ovarica nelle pazienti a bassa prognosi riproduttiva (Kuang *et al.*, 2014).

Il protocollo DuoStim, in particolare, consiste nell'associazione di una doppia stimolazione ovarica, la prima in fase follicolare e la seconda in fase luteale, e nella successiva analisi genetica preimpianto per lo studio delle aneuploidie embrionarie (*Preimplantation Genetic diagnosis for*

*Aneuploidy Testing - PGT-A*) (Ubaldi *et al.*, 2016). Tale protocollo nasce con la finalità di individuare strategie finalizzate alla riduzione del *time to pregnancy*, definito come “il numero di mesi di rapporti sessuali non protetti che trascorrono prima che avvenga il concepimento”. L’età è infatti il principale parametro in grado di condizionare la capacità riproduttiva di una donna; i 35 anni, in particolare, configurano una netta linea di demarcazione nella stratificazione temporale delle pazienti di “età riproduttiva avanzata” (Goossens *et al.*, 2009). Questo può essere attribuito da un lato al graduale e fisiologico esaurimento della riserva ovarica in funzione del tempo e dall’altro alla progressiva diminuzione della competenza ovocitaria/embrionale, identificata come la capacità di “generare un nato vivo” (Keefe *et al.*, 2015; Cimadomo *et al.*, 2018). Il tasso di aneuploidie ovocitarie, infatti, aumenta in maniera direttamente proporzionale all’età: più nello specifico, si stima che dai 35 anni, età in cui circa il 50% degli ovociti risulta aneuploide, si arrivi ad una percentuale di aneuploidie di circa il 90% all’età di 42 anni (Franasiak *et al.*, 2014; Capalbo *et al.*, 2017). In particolare, si stima che la probabilità di produrre una blastocisti euploide sia addirittura inferiore al 5% nelle donne con più di 43 anni (Ubaldi *et al.*, 2017; Vaiarelli *et al.*, 2018a). Abbinare due stimolazioni ovariche nell’ambito dello stesso ciclo mestruale rappresenta dunque, per le pazienti di età riproduttiva avanzata, una concreta possibilità di massimizzare il recupero ovocitario, bilanciando il tasso di aneuploidie cromosomiche (Vaiarelli *et al.*, 2017).

Nell’ambito delle strategie volte all’ottimizzazione della gestione delle pazienti a bassa prognosi riproduttiva il gruppo POSEIDON (*Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number*) nel 2016 ha gettato le basi per un approccio di maggiore personalizzazione terapeutica (POSEIDON group, 2016; Humaidan *et al.*, 2016; Esteves *et al.*, 2018; Conforti *et al.*, 2019c; Esteves *et al.*, 2021). In particolare, questo modello integra i dati sull’età, sui marcatori di riserva ovarica e sulle precedenti risposte alla stimolazione ovarica, stratificando le pazienti in quattro sottogruppi con una risposta ovarica "attesa" o "inaspettata" alla stimolazione con gonadotropine esogene. L’obiettivo principale del gruppo POSEIDON, in particolare, è definire la strategia ideale per ottimizzare il numero di ovociti necessari ad ottenere almeno una blastocisti

euploide in ogni paziente con diversa risposta ovarica alle gonadotropine esogene. Il gruppo 4 POSEIDON, in particolare, comprende il profilo di pazienti a peggiore prognosi riproduttiva (età >35 anni, AFC <5, AMH <1.2 ng/ml). Nell'ambito di strategie finalizzate alla riduzione del *time to pregnancy*, tale sottogruppo di pazienti potrebbe dunque essere quello maggiormente in grado di beneficiare di protocolli di accumulo ovocitario (Haahr *et al.*, 2019).

L'ipotesi di sfruttare la responsività alle gonadotropine nella fase luteale poggia le sue basi anche su recenti evidenze che sembrerebbero suggerire risultati comparabili in termini di maturazione ovocitaria, tassi di blastulazione e percentuali di aneuploidie tra la stimolazione di fase follicolare e quella di fase luteale (Vaiarelli *et al.*, 2018b). In alcuni studi, la stimolazione in fase luteale è stata inoltre associata, rispetto alla follicolare, a un maggiore recupero ovocitario e a un numero significativamente più elevato di blastocisti (Cimadomo *et al.*, 2018).

Anche le giovani pazienti con una riserva ovarica inferiore ai limiti attesi per età (Gruppo 3 POSEIDON - età <35 anni, AFC <5, AMH <1.2 ng/ml) rappresentano una categoria di pazienti strettamente dipendenti dalla variabile "tempo" (Conforti *et al.*, 2019d; Haar *et al.*, 2019). Sebbene anagraficamente tali pazienti risultino più giovani delle pazienti di gruppo 4 POSEIDON, con un tasso di euploidia per ovociti ed embrioni superiore al 50%, non è improbabile che la finestra per rispondere alla stimolazione ovarica per tali pazienti possa essere ridotta. Pertanto, anche per tale sottocategoria, si delineano scenari nei quali la tempestività dei programmi di preservazione della fertilità rappresenta un aspetto cruciale.

L'esistenza all'interno di un singolo ciclo mestruale di molteplici onde follicolari, tutte potenzialmente responsive alle gonadotropine esogene, ha infine rappresentato un invitante approccio terapeutico nell'ambito dei trattamenti clinici urgenti e "indifferibili", quali quelli oncologici, nei quali spesso non è possibile subordinare l'inizio della stimolazione ovarica alla fase follicolare (Vaiarelli *et al.*, 2020). Interessando la proporzione di follicoli primordiali nella donna, infatti, i trattamenti per il cancro sono spesso gonadossici (Meirow and Nugent 2001; Oktem and Oktay 2007) ed impattano in maniera significativa sulla riserva ovarica, aumentando

significativamente il rischio di amenorrea transitoria o permanente, insufficienza ovarica prematura, menopausa precoce e quadri di infertilità, in maniera strettamente dipendente dall'età della paziente, dalla dose cumulativa di chemioterapico e dal tipo di agente citotossico (Bonadonna and Valagussa, 1985; Bines *et al.*, 1996; Meirow *et al.*, 1999; Sonmezer and Oktay., 2004; Letourneau *et al.*, 2012; Donnez and Dolmans 2017, AIOM, 2018). Gli agenti alchilanti (in particolare ciclofosfamide, ifosfamide, nitrosuree, clorambucil, melfalan, busulfano, procarbazine, carmustina, lomustina) utilizzati nel trattamento del cancro della mammella, in particolare, sono quelli maggiormente tossici per il tessuto ovarico (Meirow *et al.*, 1999; Meirow and Nugent, 2001) poiché, non essendo ciclo-specifici, hanno impatto sia sulle cellule quiescenti che su quelle in attiva replicazione. La loro azione si esplica in maniera diretta sul DNA con effetti tossici principalmente sui follicoli primordiali. Anche i derivati del platino, come carboplatino e cisplatino, esercitano effetti negativi in tal senso (Simon *et al.*, 2005).

La radioterapia, alla stessa maniera, sembrerebbe impattare in maniera negativa sul potenziale riproduttivo. Le radiazioni ionizzanti, in particolare, provocano un'interruzione del normale ciclo proliferativo cellulare inducendo distruzione cellulare apoptosi mediata, nonostante gli ovociti siano mitoticamente inattivi. E' importante sottolineare come, analogamente ai chemioterapici, il danno sia età e dose dipendente.

Nella stragrande maggioranza dei casi l'intervallo tra la diagnosi di cancro e l'inizio del trattamento antineoplastico è molto breve, di conseguenza, in tali circostanze, si delinea l'esigenza di ricorrere a trattamenti tempestivi di preservazione della fertilità per le pazienti desiderose di prole. Tali strategie preventive diventano cruciali per le giovani pazienti che non hanno ancora completato il loro ciclo riproduttivo, per le quali ricorrere a tali trattamenti può rappresentare l'unica possibilità per realizzare il desiderio di genitorialità. A tal proposito le linee guida nazionali e internazionali sottolineano come le conseguenze sulla futura fertilità, nonché la messa in atto di strategie preventive per la preservazione della stessa, vadano discusse in maniera chiara ed esaustiva con le pazienti prima di intraprendere i trattamenti di tipo oncologico (Duffy *et al.*, 2005; AIOM 2018).

In molte pazienti, una singola stimolazione ovarica non consente tuttavia di collezionare un numero di ovociti tale da garantire ragionevoli probabilità di gravidanza. Su questa base, laddove non si verifici l'immediata necessità di iniziare i trattamenti antineoplastici ma si abbia a disposizione una sufficiente finestra temporale, i protocolli DuoStim dovrebbero essere discussi con l'oncologo come una valida opzione per la preservazione della fertilità (Moffat *et al.*, 2014; Tsampras *et al.*, 2017; Sighinolfi *et al.*, 2018; Venturella *et al.*, 2019). La scelta di approcciare a tali metodiche è subordinata non solo alla permissività della situazione clinica, ma e soprattutto, alla valutazione del potenziale riproduttivo (età, livelli sierici di AMH, AFC). L'evidenza di unità follicolari in fase luteale, potenzialmente in grado di completare il ciclo ovulatorio, hanno dato infine il via all'attuazione di protocolli di stimolazione *random*, consentendo l'uso delle gonadotropine per stimolare la crescita follicolare in qualsiasi momento del ciclo mestruale. La scelta di optare per protocolli di stimolazione *random* è facilmente attuabile dal momento che non c'è necessità, per tale sottogruppo di pazienti, di ricorrere ad una sincronizzazione ovaio-endometrio.

A tal proposito, il Centro di Sterilità ed Infertilità di Coppia (Programma Intradipartimentale di Endocrinologia della Riproduzione ed Oncofertilità) della AOU Federico II, con responsabile il prof. Carlo Alviggi, si è fatto promotore di un progetto mirato alla "Realizzazione di una rete regionale interdisciplinare per l'attuazione di percorsi diagnostico-terapeutici finalizzati alla preservazione della fertilità in giovani affetti da patologia neoplastica e al successivo supporto alla procreazione dei soggetti guariti", autorizzato dalla Regione Campania (Decreto Commissario ad Acta n. 105 del 01/10/2014).

In questo lavoro di tesi, sono riportati 7 casi clinici di pazienti, di cui 3 con diagnosi oncologica e 4 con diagnosi di insufficienza ovarica prematura, sottoposte a protocollo di stimolazione ovarica DuoStim finalizzato all'accumulo ovocitario, mediante l'utilizzo di analoghi del GnRH e gonadotropine esogene. Tale trattamento, nel caso delle pazienti oncologiche, è stato eseguito prima dell'inizio dei trattamenti antineoplastici. Le pazienti sono stati arruolate presso il Centro di Sterilità ed Infertilità di Coppia (Programma Intradipartimentale di Endocrinologia della Riproduzione ed

Oncofertilità) della AOU Federico II. *L'iter* terapeutico per le pazienti con diagnosi oncologica è stato approvato da un *team* di oncologi mediante *counselling* multidisciplinare dedicato. Prima di essere arruolate nello studio e sottoposte al protocollo di stimolazione Duostim, le pazienti hanno firmato modulo di consenso scritto completo. Per ogni paziente è stata studiata la riserva ovarica mediante dosaggio dei livelli sierici di AMH ed esecuzione di AFC (eseguita, laddove compatibile con la tempistica, in fase follicolare precoce). La tabella 1 riporta età, diagnosi, parametri di riserva ovarica e caratteristiche del protocollo di stimolazione Duostim dei 7 casi clinici oggetto di studio.

## 4.1 Materiali e metodi

### Caso clinico 1

Il primo caso clinico è rappresentato da una paziente di 34 anni con una storia di carcinoma endometriale a cellule chiare G2. Dopo la diagnosi di carcinoma, la paziente è stata sottoposta a un primo trattamento con dispositivo intrauterino a base di levonorgestrel (Mirena, Bayer, Milano, Italia) 20 µg/24 h, in attesa di isterectomia.

La paziente mostrava livelli di AMH pari a 0.26 ng/ml e AFC pari a 5. Per la natura ormono-sensibile del tumore, è stato utilizzato protocollo di stimolazione con aggiunta di inibitore di aromatasi, alla dose di 2.5 mg al giorno [Letrozolo (Femara, Novartis Farma S.p.A., Milano, Italia)] a partire dal giorno prima di iniziare la stimolazione ovarica. Per la paziente è stata scelta una dose quotidiana sottocutanea di gonadotropine pari a 225 UI di r-hFSH (Gonal F, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia). In presenza di almeno un follicolo di diametro pari a 14 mm, alle gonadotropine sono state aggiunte iniezioni sottocutanee di GnRH-ant (0.25 mg) (Cetrorelix, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia) per l'inibizione dell'ovulazione precoce. In presenza di almeno un follicolo di diametro >17 mm è stata indotta l'ovulazione con Triptorelina sottocutanea (0.2mg/ml) (Fertipeptil, Ferring S.p.A., Milano, Italia). Il prelievo degli ovociti è stato eseguito dopo 35 ore dall'induzione dell'ovulazione. Durante la stimolazione ovarica sono stati registrati i seguenti valori ematici di E<sub>2</sub> e progesterone (P): 68 pg/ml e 0.24 ng/ml al 5° giorno di stimolazione ovarica, 297 pg/ml e 1 ng/ml il giorno del picco di E<sub>2</sub> e 20 pg/ml e 6.93 ng/ml dopo il prelievo ovocitario. Sono stati recuperati 5 ovociti, di cui 4 allo stadio MII. Gli stessi sono stati crioconservati. Il protocollo Duostim proposto per la paziente è stato effettuato eseguendo una seconda stimolazione iniziata 9 giorni dopo il primo *pick up* ovocitario. È stato seguito lo stesso protocollo di stimolazione (con aggiunta di letrozolo), ma la dose quotidiana di r-hFSH è stata aumentata a 250 UI. Sono stati prelevati e crioconservati 7 ovociti (tutti MII). La somministrazione di Letrozolo è stata continuata fino a valori di E<sub>2</sub> superiori a 50 pg/ml, poi interrotta.

## Caso clinico 2

Il secondo caso si riferisce a una paziente di 34 anni con diagnosi di linfoma non-Hodgkin a cellule B di alto grado (3A) e tipo follicolare (Ki67: 50%), candidata a radioterapia e terapia molecolare. In anamnesi, la paziente riportava storia di un aborto spontaneo alla 5<sup>a</sup> settimana di amenorrea da FIVET e altri 3 cicli ICSI esitati in un risultato negativo.

La paziente mostrava livelli sierici di AMH pari a 1.95 ng/ml e AFC pari a 10 (eseguita in fase non follicolare). A causa dell'urgenza di intraprendere il trattamento antineoplastico, la stimolazione ovarica è iniziata al 21° giorno di ciclo mestruale, con 225 UI giornaliere di r-hFSH (Gonal F, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia), aumentate a 300 UI dal 6° giorno di stimolazione. In presenza di almeno un follicolo di diametro pari a 14 mm, alle gonadotropine sono state aggiunte iniezioni sottocutanee di GnRH-ant (0.25 mg) (Cetrorelix, Merck Serono S.p.A, Roma, Italia) per l'inibizione dell'ovulazione precoce. L'induzione dell'ovulazione è stata eseguita con un'iniezione in bolo di Triptorelina sottocutanea (0.2 mg/ml) (Fertipeptil, Ferring S.p.A., Milano, Italia). Il *pick up* ovocitario è stato eseguito dopo 35 ore dall'induzione dell'ovulazione. Durante la stimolazione ovarica, i valori ematici di E<sub>2</sub> e P sono risultati pari, rispettivamente, a 61 pg/ml e 0.23 ng/ml al 5° giorno di stimolazione e 986 pg/ml e 0.78 ng/ml al 10° giorno. Sono stati recuperati 6 ovociti, di cui 5 MII sono stati crioconservati. Dopo 5 giorni dal primo prelievo ovocitario è stato eseguito un secondo ciclo di stimolazione con lo stesso protocollo, utilizzando 300 UI di r-hFSH. I livelli di E<sub>2</sub> e P sono risultati rispettivamente pari a 186.39 pg/ml e 0.75 ng/ml al 5° giorno di stimolazione e 845 pg/ml e 0.55 ng/ml all'10° giorno di stimolazione. La seconda stimolazione si è conclusa con il recupero di 6 ovociti, di cui 4 ovociti MII crioconservati.

### Caso clinico 3

Il terzo caso clinico è riferito a una paziente di 41 anni con una storia di quadrantectomia sinistra per carcinoma mammario infiltrante duttale NOS G2 (ER 70%; PgR 0%; Ki67 35%; HER2 1+) e con linfonodo sentinella risultato negativo. La paziente mostrava livelli sierici di AMH pari a 2.19 ng/ml e AFC pari a 11 (eseguita non in fase follicolare). La prima stimolazione ovarica è iniziata nella fase luteale data l'urgenza di iniziare la chemioterapia. Per la natura ormono-sensibile del tumore, è stato utilizzato protocollo di stimolazione con aggiunta di inibitore di aromatasi, alla dose di 2.5 mg al giorno [Letrozolo (Femara, Novartis Farma S.p.A., Milano, Italia)] a partire da due giorni prima di iniziare la stimolazione ovarica. Per la paziente è stata scelta una dose quotidiana sottocutanea di gonadotropine pari a 225 UI di r-hFSH (Gonal F, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia). In presenza di almeno un follicolo di diametro pari a 14 mm, alle gonadotropine sono state aggiunte iniezioni sottocutanee di GnRH-ant (0.25 mg) (Cetrorelix, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia) per inibizione dell'ovulazione precoce. L'induzione dell'ovulazione è stata eseguita con un'iniezione sottocutanea in bolo di Triptorelina (0.2 mg/ml) (Fertipeptil, Ferring S.p.A., Milano, Italia) in presenza di almeno un follicolo di diametro >17 mm. Il *pick up* ovocitario è stato eseguito dopo 35 ore dall'induzione dell'ovulazione. Durante la stimolazione ovarica, i valori ematici di E<sub>2</sub> e P sono risultati pari, rispettivamente, a 85 pg/ml e 11.5 ng/ml (al 5° giorno di stimolazione), pari a 123.3 pg/ml e 1.4 ng/ml (al 9° giorno di stimolazione) e, infine, pari a 331.2 pg/ml e 2 ng/ml (al giorno di induzione dell'ovulazione). Il primo *pick up* ovocitario ha portato al recupero di 7 ovociti, di cui 6 ovociti di classe MII. I livelli ematici di E<sub>2</sub> e P dopo il primo recupero ovocitario sono risultati rispettivamente pari a 17 pg/ml e 8 ng/ml. La seconda stimolazione è stata eseguita 13 giorni dopo il primo *pick up* ovocitario utilizzando la stessa dose di gonadotropine e lo stesso protocollo di induzione dell'ovulazione. La seconda stimolazione si è conclusa con il recupero di 7 ovociti, tutti MII. Gli ovociti MII derivanti dalle due stimolazioni ovariche sono stati crioconservati. La somministrazione di letrozolo è stata continuata fino a valori di E<sub>2</sub> superiori a 50 pg/ml, poi interrotta.

#### Caso clinico 4

Il quarto caso clinico si riferisce a una paziente di 36 anni con sindrome di Mayer-Rokitansky-Kuster Hauser in attesa di trapianto di utero. Il quadro ecografico mostrava utero e ovaie di aspetto “rudimentale”, queste ultime con un'ecostruttura prevalentemente compatta. All'esame clinico è stata confermata l'assenza della porzione superiore della vagina.

La paziente mostrava livelli sierici di AMH pari a 0.55 ng/ml, FSH pari a 1.5 mIU/ml e AFC pari a 5. Il protocollo di stimolazione è stato eseguito con iniezioni giornaliere sottocutanee di 250 UI di r-hFSH (Gonal F, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia) aumentando poi la dose fino a 300 UI. È stato utilizzato un protocollo flessibile con GnRH-ant (0.25 mg) (Cetrorelix, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia) a partire dal giorno 11° di stimolazione, al fine di inibire l'ovulazione precoce. L'induzione dell'ovulazione è stata eseguita con bolo sottocutaneo di Triptorelina (0.2 mg/ml) (Fertipeptil, Ferring S.p.A., Milano, Italia). Durante la stimolazione ovarica, i valori ematici di E<sub>2</sub> e P sono risultati pari, rispettivamente, a 240 pg/ml e 11.5 ng/ml (al 7° giorno di stimolazione) e pari a 560 pg/ml e 1.4 ng/ml (al giorno dell'induzione dell'ovulazione). Gli ovociti sono stati recuperati 35 ore dopo il *triggering* con GnRH-a. Sono stati recuperati 3 ovociti, 2 dei quali erano in fase MII.

Una seconda stimolazione è iniziata 4 giorni dopo il *pick up* ovocitario, con lo stesso protocollo. L'r-hFSH è stato aumentato fino a 350 UI dal giorno 8° della stimolazione. In questo caso, si è optato per un doppio protocollo *trigger* per l'induzione dell'ovulazione: Triptorelina (0.2 mg/ml) più hCG 5000 UI sottocute (Gonasi HP, IBSA S.p.A., Lodi, Italia). Sono stati recuperati 8 ovociti, tutti allo stadio MII.

## Caso clinico 5

Il quinto caso clinico si riferisce ad una paziente di 27 anni con diagnosi di insufficienza ovarica prematura (POI – *Premature Ovarian Insufficiency*) di tipo idiopatico. La paziente non presentava in anamnesi storia di menopausa precoce in familiari di primo grado. Alla visita eseguita in fase follicolare precoce, l'AFC risultava pari a 5 e i livelli di AMH pari a 0.6 ng/ml con valori di FSH, LH ed E<sub>2</sub> rispettivamente pari a 9.1 mUI/ml, 3.65 mUI/ml e 23.5 pg/ml.

Il protocollo di stimolazione è stato eseguito con iniezioni giornaliere sottocutanee di 300 UI di r-hFSH (Gonal F, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia) a partire dal 2° giorno di ciclo mestruale. È stato utilizzato un protocollo flessibile con GnRH-ant (0.25 mg) (Cetrorelix, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia) a partire dal giorno 5° di stimolazione, al fine di inibire l'ovulazione precoce. L'induzione dell'ovulazione è stata eseguita con bolo sottocutaneo di Triptorelina (0.2 mg/ml) (Fertipeptil, Ferring S.p.A., Milano, Italia). Gli ovociti sono stati recuperati 35 ore dopo il *triggering* con agonista del GnRH. Sono stati recuperati 4 ovociti, 2 dei quali erano in fase MII. I livelli sierici di E<sub>2</sub> e P risultavano pari a 184 pg/ml e 0.2 ng/ml rispettivamente (5° giorno di stimolazione) e pari a 780 pg/ml e 0.73 ng/ml rispettivamente (10° giorno di stimolazione). La seconda stimolazione ovarica è iniziata al 5° giorno post *pick up* ovocitario, utilizzando 300 UI di r-hFSH con integrazione di GnRH-ant al 5° giorno dall'inizio delle gonadotropine. L'induzione dell'ovulazione è stata eseguita con bolo sottocutaneo di Triptorelina (0.2 mg/ml). Sono stati prelevati 4 ovociti, di cui 2 MII. I livelli sierici di E<sub>2</sub> e P sono risultati rispettivamente pari a 109 pg/ml e 1.12 ng/ml (7° giorno di stimolazione), 235 pg/ml e 1 ng/ml (9° giorno di stimolazione) e 398 pg/ml e 0.97 ng/ml (11° giorno di stimolazione).

## Caso clinico 6

Il sesto caso clinico si riferisce ad una paziente di 27 anni con diagnosi di POI idiopatica. La paziente non presentava in anamnesi storia di menopausa precoce in familiari di primo grado.

Alla visita ginecologica eseguita al 3° giorno di ciclo mestruale, l'AFC risultava pari a 7 e l'AMH pari a 0.59 ng/ml con valori di FSH, LH ed E<sub>2</sub> rispettivamente pari a 4.8 mUI/ml, 2.7 mUI/ml e 59.6 pg/ml.

Il protocollo di stimolazione è stato eseguito con somministrazioni giornaliere di r-hFSH pari a 250 UI (Gonal F, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia) a partire dal 2° giorno di ciclo mestruale. E' stato utilizzato un protocollo flessibile con GnRH-ant (0.25 mg) (Cetrorelix, Merck Serono S.p.A, Roma, Italia) a partire dal giorno 5° di stimolazione, al fine di inibire l'ovulazione precoce. L'induzione dell'ovulazione è stata eseguita con bolo sottocutaneo di Triptorelina (0.2 mg/ml) (Fertipeptil, Ferring S.p.A., Milano, Italia). Gli ovociti sono stati recuperati 35 ore dopo il *triggering* con agonista del GnRH. Sono stati recuperati 3 ovociti, 3 dei quali erano in fase MII.

I valori di E<sub>2</sub> e P sono risultati rispettivamente pari a 290 pg/ml e 0.6 ng/ml (5° giorno di stimolazione) e pari a 602 pg/ml e 1.1 ng/ml (9° giorno di stimolazione).

Al 5° giorno dopo il primo *pick up* ovocitario si è proceduto con una seconda stimolazione. Anche in questo caso si è scelta una dose di r-hFSH pari a 250 UI (Gonal F, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia), con aggiunta di GnRH-ant (Cetrorelix, Merck Serono S.p.A, Roma, Italia) secondo lo schema del protocollo flessibile. L'induzione dell'ovulazione è stata eseguita con bolo sottocutaneo di Triptorelina (0.2 mg/ml) (Fertipeptil, Ferring S.p.A., Milano, Italia). Gli ovociti sono stati recuperati 35 ore dopo il *triggering* con agonista del GnRH. Sono stati recuperati 3 ovociti, tutti in fase MII. Al 12° giorno di stimolazione i valori di E<sub>2</sub> e P sono risultati rispettivamente pari a 616 pg/ml e 0.8 mg/ml.

## Caso clinico 7

Il settimo caso clinico si riferisce a una paziente di 32 anni, con storia di POI idiopatica. Anche in questo caso dall'anamnesi familiare non sono emersi casi di menopausa precoce nel ramo familiare.

Alla visita ginecologica, la paziente mostrava un'AFC pari a 7 e un AMH pari a 0.52 ng/ml. Le gonadotropine dosate in fase follicolare precoce presentavano i seguenti valori: FSH: 14.5 mUI/ml, LH: 8 mUI/ml, E<sub>2</sub>: 25 pg/ml.

Il protocollo di stimolazione, iniziato a partire dal 2° giorno di stimolazione, è stato eseguito con dosaggi giornalieri di r-hFSH pari a 225 UI (Gonal F, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia). In 6° giornata di stimolazione, a causa di una risposta ovarica lenta, si è proceduto all'aggiunta di r-hLH con un dosaggio giornaliero di 75 UI (Luveris, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia), introducendo GnRH-ant (0.25 mg) (Cetrorelix, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia) al fine di inibire l'ovulazione precoce. L'induzione dell'ovulazione è stata eseguita con bolo sottocutaneo di Triptorelina 0.2 mg/ml (Fertipeptil, Ferring S.p.A., Milano, Italia). Dal *pick up* ovocitario sono stati recuperati 7 ovociti, tutti MII. Si è dunque proceduto al loro congelamento.

I valori di E<sub>2</sub> e P sono risultati rispettivamente pari a 230 pg/ml e 0.2 ng/ml (6° giorno di stimolazione) e pari a 967 pg/ml e 0.7 ng/ml (8° giorno di stimolazione).

Al 5° giorno dopo il primo *pick up* ovocitario si è proceduto con una seconda stimolazione di fase luteale, utilizzando lo stesso protocollo. In questo caso l'r-hLH è stato integrato a partire dall'inizio della stimolazione. Il GnRH-ant (0.25 mg) (Cetrorelix, Merck Serono S.p.A., Roma, Italia) è stato aggiunto in 7<sup>a</sup> giornata. L'induzione dell'ovulazione è stata eseguita con bolo sottocutaneo di Triptorelina 0.2 mg/ml (Fertipeptil, Ferring S.p.A., Milano, Italia). Dal *pick up* ovocitario sono stati recuperati 5 ovociti, di cui 4 MII.

I valori di E<sub>2</sub> e P sono risultati rispettivamente pari a 362 pg/ml e 1.7 ng/ml (6° giorno di stimolazione) e pari a 695 pg/ml e 0.9 ng/ml (9° giorno di stimolazione).

## 4.2 Risultati

**Tabella 1.** Et , diagnosi, parametri di riserva ovarica e caratteristiche del protocollo di stimolazione Duostim dei 7 casi clinici oggetto di studio

N	1	2	3	4	5	6	7
Et�	34	34	41	36	27	27	32
Diagnosi	K endometrio	L.N.H	K mammella	M.R.K.H.	POI	POI	POI
AFC (n)	5	10	11	5	5	7	7
AMH (ng/ml)	0.26	1.95	2.19	0.55	0.6	0.59	0.52

### 1° COS

r-hFSH (UI)	225	225-300	225	250-300	300	250	225
r-hLH (UI)							75
Inizio GnRH-ant (gg)	7	9	5	9	5	5	6
I.O.	T	T	T	T	T	T	T
COS (n gg)	12	11	11	13	11	10	10
Ovociti recuperati (n)	5	6	7	3	4	3	7
Ovociti MII (n)	4	5	6	2	2	3	7

### 2° COS

r-hFSH (UI)	250	300	225	300-350	300	250	225
r-hLH (UI)							75
Inizio GnRH-ant (gg)	10	9	8	11	5	8	7
I.O.	T	T	T	T + hCG	T	T	T
COS (n gg)	12	11	13	15	11	13	11
Ovociti recuperati (n)	7	6	7	8	2	3	5
Ovociti MII (n)	7	4	7	8	2	3	4
Ovociti recuperati (1° + 2° COS) (n)	12	12	14	11	6	6	12
Ovociti MII (1° + 2° COS) (n)	11	9	13	10	4	6	11

AFC: Antral Follicular Count, AMH: Anti-mullerian Hormone, FSH: Follicle Stimulating Hormone, LH: Luteinizing Hormone; GnRH-ant: Gonadotropin Releasing Hormone - antagonist; GG: giorni, I.O.: Induzione dell'Ovulazione, COS: Controlled Ovarian Stimulation, MII: Metaphase II, LNH: Linfoma non Hodgkin, MRKH: Mayer Rokitansky Kuster Hauser; POI: Premature Ovarian Insufficiency, T: Triptorelina; hCG: Human Chorionic Gonadotropin

### 4.3 Discussione

Nella Tabella 1 sono riportati l'età, la diagnosi, i parametri di riserva ovarica e le caratteristiche del protocollo di stimolazione Duostim dei 7 casi clinici oggetto di studio, inseriti nel programma di preservazione della fertilità del Centro Federiciano.

I risultati emersi mostrano come l'impiego di un duplice protocollo di stimolazione nell'ambito dello stesso ciclo mestruale consenta di massimizzare la resa ovarica, subordinando le dinamiche di regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi all'impiego delle gonadotropine esogene anche nella fase luteale e sfruttando le onde follicolari multiple. In tutte e 7 le pazienti, infatti, sommando i risultati ottenuti dalle due stimolazioni consecutive, è stato possibile ottenere una maggiore percentuale di ovociti MII; il numero totale degli stessi è risultato simile al valore *target* atteso in funzione dell'età e degli specifici parametri di riserva ovarica (Humaidan *et al.*, 2016). Queste osservazioni sono più evidenti nei casi oggetti di studio caratterizzati da una minore riserva ovarica. I risultati mostrano come, inoltre, in 2 casi su 4 sia stato possibile ricorrere ad un approccio di stimolazione ovarica di tipo *random*, evidenza che supporta la responsività dei follicoli alle gonadotropine in una fase del ciclo mestruale che non necessariamente corrisponde a quella follicolare. Infine, in 3 casi su 7, la stimolazione eseguita in fase luteale è risultata in un numero maggiore di ovociti MII, a fronte di un numero di ovociti paragonabile fra le fasi follicolare e luteale nei casi 5 e 6.

I principali punti di forza del presente *case series* sono rappresentati dal disegno prospettico e dalla utilizzazione di modelli clinici, quali le pazienti oncologiche e le pazienti con insufficienza ovarica prematura, che senza dubbio risultano rappresentativi del concetto di “bassa prognosi riproduttiva”.

I limiti della presente casistica, al contrario, si basano sulla esiguità dei dati, sulla eterogeneità clinica dei casi ma soprattutto sull'assenza di dati relativi alla qualità degli embrioni, poiché per le pazienti oggetto di studio si è proceduto alla crioconservazione dei singoli gameti. Per tale motivo, non è stato possibile effettuare analisi comparative tra embrioni ottenuti dalla stimolazione in fase follicolare e luteale. In tal senso, comunque, i dati della letteratura sono estremamente rassicuranti in relazione all'evidenza che la competenza degli ovociti e degli embrioni derivanti dalle

stimolazioni di fase follicolare e di fase luteale (tassi di euploidia delle singole blastocisti e *outcome* clinici dopo il trasferimento di singolo embrione euploide) sia in effetti comparabile (Moffat *et al.*, 2014; Vaiarelli *et al.*, 2018).

Anche nel caso della paziente affetta da sindrome di Mayer-Rokitansky-Kuster Hauser la scelta di utilizzare una doppia stimolazione ha riflettuto la necessità di attuare un programma di preservazione della fertilità. A tal proposito, la letteratura scientifica descrive casi di pazienti affette da malformazioni del tratto genitale in cui la risposta ormonale al protocollo di stimolazione con gonadotropine è stata simile a quella di pazienti con normale anatomia pelvica (Wood *et al.*, 1999); analogamente, nel nostro studio, il numero di ovociti recuperati è risultato vicino al *target* ideale, con un'alta percentuale di ovociti MII (91%).

In merito al disegno dello studio, è importante sottolineare che la stimolazione ovarica è stata adattata alle caratteristiche specifiche delle pazienti secondo il modello clinico predittivo dell'“ART Calculator”. Tale approccio basa il suo razionale sulla stima del numero ideale di ovociti MII necessari per ottenere almeno una blastocisti euploide, calcolati in funzione dell'età, dei parametri di riserva ovarica e delle caratteristiche del seminale (Esteves *et al.*, 2019). Nei programmi di accumulo, e nello specifico per le coppie a bassa prognosi riproduttiva, la scelta “età-correlata” di proseguire la stimolazione nella fase luteale risulta strettamente dipendente dal tasso di euploidia previsto per le blastocisti derivanti dalla stimolazione di fase follicolare. Il DuoStim rappresenta infatti una scelta concreta per le pazienti a bassa prognosi ai fini di aumentare il numero di ovociti recuperati e di massimizzare il tasso cumulativo di nati vivi (*Cumulative Live Birth Rate - CLBR*) (Drakopoulos *et al.*, 2016). Quest'ultimo parametro rappresenta infatti, attualmente, l'indicatore principale del successo nella PMA (Drakopoulos *et al.*, 2019).

Nei casi oggetti di studio, la decisione di eseguire una doppia stimolazione è stata il frutto di un approccio *multi-step*. Dopo attribuzione di ogni singola paziente allo specifico sottogruppo POSEIDON, si è proceduto alla stima della riserva ovarica mediante valutazione dell'AMH e dell'AFC. Tali dati, *matchati* per età anagrafica, sono stati utilizzati ai fini del calcolo del numero di

ovociti necessario all'ottenimento di almeno una blastocisti euploide. In tali pazienti, che rappresentano modelli clinici di bassa prognosi riproduttiva, la decisione di eseguire una seconda stimolazione è stata dettata dalla necessità di optare per uno stoccaggio ottimale di ovociti oltre che naturalmente subordinata alla disponibilità temporale in relazione all'urgenza di iniziare i trattamenti chemioterapici.

I risultati del presente studio confermano infatti come, compatibilmente con le tempistiche dettate dall'iter terapeutico nei casi delle pazienti oncologiche, l'impiego delle gonadotropine possa essere modulato e "riadattato" al fine di sfruttare tutte le onde follicolari all'interno di un singolo ciclo mestruale, massimizzando, di conseguenza, la resa ovarica in pazienti a bassa prognosi riproduttiva. La scelta di incrementare il dosaggio di gonadotropine e/o abbinare, come nel caso 7, l'impiego dell'r-hLH, è stata infatti intrapresa al fine di puntare ad un maggior recupero ovocitario.

La scelta decisamente innovativa di subordinare le fisiologiche dinamiche di follicologenesi ad una stimolazione ripetuta getta le sue basi su precedenti studi eseguiti su animali, dai quali è emersa l'evidenza che gruppi sincroni di follicoli siano in grado di crescere e svilupparsi quando stimolati con gonadotropine esogene anche in presenza del corpo luteo (Pieterse *et al.*, 1988; Pieterse *et al.*, 1991; Galli *et al.*, 2001). L'assenza di qualsiasi tipo di interferenza da parte del progesterone di fase luteale è stata poi confermata ulteriormente osservando come le dinamiche follicolari (es. durata e regolarità dell'estro) non venissero modificate anche dopo ripetuti prelievi ovocitari (Garcia and Salaheddine, 1998).

Nel presente studio, alla stessa maniera, gli elevati livelli di progesterone non hanno interferito con lo sviluppo follicolare, e tale dato è particolarmente evidente nel terzo caso. Data l'urgenza di iniziare il trattamento antineoplastico, le gonadotropine sono state somministrate a partire dal 21° giorno di ciclo mestruale con livelli plasmatici di progesterone pari a 11.5 ng/ml. Nonostante tale evidenza, la stimolazione si è conclusa con il recupero di 6 ovociti MII su 7, una percentuale pari all'85.7%. E' importante inoltre osservare come in 3 casi su 7 la stimolazione eseguita in fase luteale sia risultata in un numero maggiore di ovociti MII. Tali risultati, seppur esigui, analogamente

a quanto descritto in letteratura, sembrerebbero suggerire che la presenza del corpo luteo non influisca sugli esiti della stimolazione. Precedenti studi eseguiti su animali hanno d'altra parte suggerito che il progesterone possa fungere da segnale endocrino in grado di modulare la sensibilità delle gonadotropine al GnRH ipotalamico, tuttavia al momento i dati della letteratura non sono sufficientemente robusti.

Circa la scelta del protocollo di induzione dell'ovulazione, in tutti i casi del presente studio si è optato per l'utilizzo del GnRH-a, sfruttando l'effetto *flare* ipofisario. Tale strategia trova il suo principale impiego nei programmi di accumulo ovocitario, dal momento che non si delinea la necessità di una sincronizzazione ovaio-endometrio. D'altra parte, studi effettuati su pazienti a bassa prognosi, definite secondo i criteri di Bologna, hanno evidenziato come il protocollo con GnRH-a sia associato al recupero, seppur non significativo, di un maggior numero di ovociti maturi, rispetto al protocollo con GnRH-ant (Sunkara *et al.*, 2014), con tassi di cancellazione dei cicli significativamente più bassi. La plausibilità biologica di tali risultati potrebbe trovare una motivazione nella sincronizzazione follicolare ottenuta con la *down-regulation* operata dal GnRH-a. Tale sincronizzazione risulta cruciale per le pazienti con scarsa riserva ovarica; in questi ultimi casi, infatti, si assiste spesso a incrementi dei livelli di FSH ipofisari nella fase tardo-luteale, cui seguono fenomeni di reclutamento precoce del follicolo dominante in grado a sua volta di sopprimere la crescita del restante *pool* follicolare. Nel presente studio, pertanto, la scelta di optare per tale protocollo è risultata il migliore compromesso fra buoni tassi di maturazione ovocitaria e strategie di migliore allineamento della coorte follicolare.

Anche se la casistica risulta esigua, i risultati del presente studio sono incoraggianti. Sfruttare la responsività follicolare nella fase luteale rappresenta uno strumento utile ed adeguato per attuare programmi di preservazione della fertilità in condizioni di estrema urgenza. La doppia stimolazione ovarica ha infatti permesso di ottimizzare il tempo e la resa ovarica senza ritardare l'inizio dei trattamenti antineoplastici. Nelle pazienti candidate a trattamenti gonadotossici e dove l'inizio della

terapie non è imminente, questa strategia è fondamentale per stoccare più ovociti in una ridotta finestra temporale.

La combinazione della stimolazione ovarica follicolare e luteale apre nuovi scenari di applicazione del DuoStim che potrebbero essere applicati più ampiamente in futuro, anche per patologie non oncologiche, come nei casi riportati nel presente studio. Anche per le pazienti con riserva ovarica inferiore ai limiti attesi per età, preservare gli ovociti prima dell'esaurimento follicolare finale rappresenta di fatto l'unica reale e concreta strategia per evitare tecniche di tipo eterologo. L'utilizzo di un programma di accumulo ovocitario all'interno dello stesso ciclo mestruale, infine, migliora certamente la *compliance* della paziente, abbattendo in misura sostanziale e concreta la necessità di interrompere i trattamenti (Bosch *et al.*, 2019).

In conclusione, i dati del presente studio confermano la possibilità di implementare la resa ovarica delle pazienti mediante la combinazione di due approcci clinici che contemplano l'impiego di gonadotropine esogene. Il primo consiste nel modificare l'ambiente ormonale tipico della fase estrogenica, sovvertendo i naturali meccanismi di dominanza follicolare che risultano strettamente dipendenti dalla regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi. L'obiettivo terapeutico è infatti quello di prevenire la diminuzione dell'FSH circolante che si verifica nella fase medio-follicolare e che funge da base per l'instaurarsi della dominanza follicolare. A tale approccio è possibile abbinare l'impiego delle gonadotropine in una fase diversa da quella follicolare, al fine di sfruttare le onde follicolari tipiche della fase luteale. La combinazione di questi due approcci rende l'accumulo ovocitario una possibilità concreta per le pazienti a bassa prognosi, nonché la principale strategia di preservazione della fertilità nei casi in cui non si sia ancora realizzato o concluso il proprio progetto riproduttivo.

## **BIBLIOGRAFIA**

-Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppä L, Louhio H, Tuuri T, Sjöberg J, Bützow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(8):2744-50.

-Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ, Jameson JL. Genetic causes of human reproductive disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2447-2454.

-Achrekar SK, Modi DN, Desai SK, Mangoli VS, Mangoli RV, Mahale SD. Poor ovarian response to gonadotrophin stimulation is associated with FSH receptor polymorphism. *Reprod Biomed Online* 2009;18:509-15.

-Adams GP, Singh J, Baerwald AR. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology* 2012;78:1733-48.

-Al-Inany HG, Youssef MA, Aboulghar M, Broekmans F, Sterrenburg M, Smit J, Abou-Setta AM. Gonadotrophin-Releasing Hormone Antagonists for Assisted Reproductive Technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;5:CD001750.

-Al-Inany HG, Youssef MA, Ayeleke RO, Brown J, Lam WS, Broekmans FJ. Gonadotrophin-Releasing Hormone Antagonists for Assisted Reproductive Technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;4:CD001750.

-Allegra A, Marino A, Raimondo S, Maiorana A, Gullo S, Scaglione P, Volpes A, Alessandro R. The carriers of the A/G-G/G allelic combination of the c.2039 A>G and c.-29 G>A FSH receptor polymorphisms retrieve the highest number of oocytes in IVF/ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet* 2017;34(2):263-273.

-Altmae S, Hovatta O, Stravreus-Evers A, Salumets A. Genetic predictors of controlled ovarian hyperstimulation: Where do we stand today? *Human Reproduction Update* 2011a;17:813-828.

-Altmae S, Salumets A. A novel genomic diagnostic tool for sperm quality? *Reprod Biomed Online* 2011b;22:405-407.

- Alviggi C, Mollo A, Clarizia R, De Placido G. Exploiting LH in ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* 2006;2:221-33.

-Alviggi C, Conforti A, Fabozzi F, De Placido G. Ovarian stimulation for IVF/ICSI cycles: A pharmacogenomic approach. *Medecine Therapeutique Medecine de la Reproduction, Gynecologie et Endocrinologie* 2009a;11:271-277.

-Alviggi C, Clarizia R, Pettersson K, Mollo A, Humaidan P, Strina I, Coppola M, Ranieri A, D'Uva M, De Placido G. Suboptimal response to GnRH $\alpha$  long protocol is associated with a common LH polymorphism. *Reprod Biomed Online* 2009b;18:9-14.

-Alviggi C, Clarizia R, Mollo A, Ranieri A, De Placido G. Who needs LH in ovarian stimulation? *Reprod Biomed Online* 2011;22 Suppl 1:S33-41.

-Alviggi C, Humaidan P, Ezcurra D. Hormonal, functional and genetic biomarkers in controlled ovarian stimulation: tools for matching patients and protocols. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;10:9.

-Alviggi C, Pettersson K, Longobardi S, Andersen CY., Conforti A, De Rosa P, Clarizia R, Strina I, Mollo A, De Placido G, Humaidan P. A common polymorphic allele of the LH beta-subunit gene is associated with higher exogenous FSH consumption during controlled ovarian stimulation for assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:51.

-Alviggi C, Conforti A, Esteves SC. Impact of mutations and polymorphisms of gonadotrophins and their receptors on the outcome of controlled ovarian stimulation. *Principles and Practice of Controlled Ovarian Stimulation in ART* 2015;147-156.

-Alviggi C, Conforti A, Caprio F, Gizzo S, Noventa M, Strina I, Pagano T, De Rosa P, Carbone F, Colacurci N, De Placido G. In Estimated Good Prognosis Patients Could Unexpected "Hyporesponse" to Controlled Ovarian Stimulation be Related to Genetic Polymorphisms of FSH Receptor? *Reprod Sci* 2016a;23:1103-8.

-Alviggi C, Conforti A, Santi D, Esteves SC, Andersen CY, Humaidan P, Chiodini P, De Placido G, Simoni M. Clinical relevance of genetic variants of gonadotrophins and their receptors in controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2018a;24(5):599-614.

-Alviggi C, Conforti A, Esteves SC, Vallone R, Venturella R, Staiano S, Castaldo E, Andersen CY, De Placido G. Understanding ovarian hypo-response to exogenous gonadotropin in ovarian stimulation and its new proposed Marker-The Follicle-To-Oocyte (FOI) Index. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018b;9:589.

-Alviggi C, Conforti A, Esteves SC, Andersen CY, Bosch E, Buhler K, Ferraretti AP, De Placido G, Mollo A, Fischer R, Humaidan P, International Collaborative Group for the Study of r-hLH (iCOS-LH). Recombinant luteinizing hormone supplementation in assisted reproductive technology: a systematic review. *Fertil Steril* 2018c;109:644-64.

-ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817-21.

-Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biol Reprod* 2003a;69:1023-31.

-Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. *Fertil Steril* 2003b;80:116-22.

-Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Hum Reprod Update*. Jan-Feb 2012;18(1):73-91.

-Baird D, Fraser IS. Concentration of oestrone and oestradiol in follicular fluid and ovarian venous blood of women. *Clin Endocrinol* 1975;4:259-266.

-Bartlewski PM, Baby TE, Giffin JL. Reproductive cycles in sheep. *Anim Reprod Sci* 2011;124:259-68.

-Behre HM, Greb RR, Mempel A, Sonntag B, Kiesel L, Kaltwaber P, Seliger E, Ropke F, Gromoll J, Nieschlag E, Simoni M. Significance of a common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene for the ovarian response to FSH: A pharmacogenetic approach to controlled ovarian hyperstimulation. *Pharmacogenetics and Genomics* 2005;15:451-456.

-Ben-Rafael Z, Levy T, Schoemaker J. Pharmacokinetics of follicle stimulating hormone: clinical significance. *Fertil Steril* 1995;63:689-700.

-Bonadonna G, Valagussa P. Adjuvant systemic therapy for resectable breast cancer. *J Clin Oncol* 1985;3:259-275.

-Bosch E, Bulletti C, Copperman AB, Fanchin R, Yarali H, Petta CA, Polyzos NP, Shapiro D, Ubaldi FM, Garcia Velasco JA, Longobardi S, D'Hooghe T, Humaidan P, Delphi TTP Consensus Group. How time to healthy singleton delivery could affect decision-making during infertility treatment: a Delphi consensus. *Reprod Biomed Online*. 2019;38:118-30.

-Bosch E, Alviggi C, Lispi M, Conforti A, Hanyaloglu AC, Chuderland D, Simoni M, Rainey-Fenning N, Crépieux P, Kol S, Rochira V, D'Hooghe T, Humaidan P. Reduced FSH and LH action: implications for medically assisted reproduction. *Hum Reprod* 2021;17;36(6):1469-1480.

-Brown JB. Pituitary control of ovarian function: concepts derived from gonadotropin therapy. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 1978;18:47-54.

- Capalbo A, Hoffmann ER, Cimadomo D, Maria Ubaldi F, Rienzi L. Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging. *Hum Reprod Update* 2017;23:706-22.
- Casarini L, Moriondo V, Marino M, Adversi F, Capodanno F, Grisolia C, La Marca A, La Sala GB, Simoni M. FSHR polymorphism p.N680S mediates different responses to FSH in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 2014;393:83-91.
- Casarini L, Santi D, Marino M. Impact of gene polymorphisms of gonadotropins and their receptors on human reproductive success. *Reproduction* 2015;150:R175-84.
- Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1998;69:505-510.
- Check J, Dietterich C, Houck MA. Ipsilateral versus contralateral ovary selection of dominant follicle in succeeding cycle. *Obstet Gynecol* 1991;77:247-249.
- Cheung LP, Lam PM, Lok IH, Chiu TT, Yeung SY, Tjer CC, Haines CJ. GnRH Antagonist Versus Long GnRH Agonist Protocol in Poor Responders Undergoing IVF: A Randomized Controlled Trial. *Hum Reprod (Oxford England)* 2005;20(3):616-21.
- Chikazawa K, Araki S, Tamada T. Morphological and endocrinological studies on follicular development during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metabol* 1986;62:305-313.
- Cimadomo D, Fabozzi G, Vaiarelli A, Ubaldi N, Ubaldi FM, Rienzi L. Impact of maternal age on oocyte and embryo competence. *Front Endocrinol* 2018;9:327.

-Cimadomo D, Vaiarelli A, Colamaria S, Trabucco E, Alviggi C, Venturella R, Alviggi E, Carmelo R, Rienzi L, Ubaldi FM. Luteal phase anovulatory follicles result in the production of competent oocytes: intra-patient paired case-control study comparing follicular versus luteal phase stimulations in the same ovarian cycle. *Hum Reprod* 2018;33(8):1442-1448.

-Conforti A, Alfano S, De Rosa P, Alviggi C, De Placido G. The role of gonadotropin polymorphisms and their receptors in assisted reproductive technologies and controlled ovarian stimulation: A prospective observational study. *Italian Journal of Gynaecology and Obstetrics* 2017a;29:15-21.

-Conforti A, Esteves SC, Di Rella F, Strina I, De Rosa P, Fiorenza A, Zullo F, De Placido G, Alviggi C. The role of recombinant LH in women with hypo-response to controlled ovarian stimulation: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2019a;17(1):18.

-Conforti A, Vaiarelli A, Cimadomo D, Bagnulo F, Peluso S, Carbone L, Di Rella F, De Placido G, Ubaldi FM, Huhtaniemi I, Alviggi C. Pharmacogenetics of FSH action in the female. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019b;10:398.

-Conforti A, Esteves SC, Picarelli S, Iorio G, Rania E, Zullo F, De Placido G, Alviggi C. Novel approaches for diagnosis and management of low prognosis patients in assisted reproductive technology: the POSEIDON concept. *Panminerva Med* 2019c;61(1):24-29.

-Conforti A, Esteves SC, Cimadomo D, Vaiarelli A, Di Rella F, Ubaldi FM, et al. Management of women with an unexpected low ovarian response to gonadotropin. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019d;10:387.

-Conn PM, Crowley WF Jr. Gonadotropin releasing hormone and its analogs. *Annual Review of Medicine* 1994;45:391-405.

-Čuš M., Vlaisavljević V., Repnik K., Potočnik U., Kovačić B. Could polymorphisms of some hormonal receptor genes, involved in folliculogenesis help in predicting patient response to controlled ovarian stimulation? *J. Assist. Reprod. Genet* 2019;36:47-55.

-De Castro F, Ruiz R, Montoro L, Pérez-Hernandez D, Sanchez-Casas Padilla E, Real LM, Ruiz A. Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertility and Sterility* 2003;80:571-576.

-De Mello Bianchi PH, Serafini P, Monteiro da Rocha A, Assad Hassun P, Alves da Motta EL, Sampaio Baruselli P, Chada Baracat E. Review: follicular waves in the human ovary: a new physiological paradigm for novel ovarian stimulation protocols. *Reprod Sci* 2010;17:1067-76.

-De Placido G, Mollo A, Alviggi C, Strina I, Varricchio MT, Ranieri A, Colacurci N, Tolino A, Wilding M. Rescue of IVF cycles by HMG in pituitary down-regulated normogonadotrophic young women characterized by a poor initial response to recombinant FSH. *Hum Reprod* 2001;16(9):1875-9.

-De Placido G, Alviggi C, Perino C, Strina I, Lisi F, Fasolino A, De Palo R, Ranieri A, Colacurci N, Mollo A. Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (rFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to rFSH. A multicentre, prospective, randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005;20:390-6.

-Desai SS, Achrekar SK, Pathak BR, Desai SK, Mangoli VS, Mangoli RV, Mahale RV. Follicle-stimulating hormone receptor polymorphism (G-29A) is associated with altered level of receptor expression in Granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2805-12.

-Desai SS, Achrekar SK, Paranjape SR, Desai SK, Mangoli VS, Mahale SD. Association of allelic combinations of FSHR gene polymorphisms with ovarian response. *Reprod Biomed Online* 2013;27:400-6.

-Devroey P, Fauser BC, Diedrich K. Approaches to improve the diagnosis and management of infertility. *Hum Reprod Update* 2009;15:391-408.

-Donnez J, Dolmans MM. Fertility Preservation in Women. *N Engl J Med* 2017;377(17):1657-1665.

-Drakopoulos P, Blockeel C, Stoop D, Camus M, de Vos M, Tournaye H, Polyzos NP. Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos? *Hum Reprod.* 2016;31:370-6.

-Drakopoulos P, Errazuriz J, Santos-Ribeiro S, Tournaye H, Vaiarelli A, Pluchino N, Blockeel C, Polyzos NP. Cumulative live birth rates in IVF. *Minerva Ginecol.* 2019;71:207-10.

-Duijkers IJ, Klipping C, Willemsen WN, Krone D, Schneider E, Niebch G, Hermann R. Single and multiple dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix in healthy female volunteers. *Hum Reprod Oxf Reprod* 1998;13:2392-2398.

-Duffy CM, Allen SM, Clark MA. Discussions regarding reproductive health for young women with breast cancer undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23:766-773.

-Edwards RG, Lobo R, Bouchard P. Time to Revolutionize Ovarian Stimulation. *Hum Reprod* Oxford England 1996;11(5):917-9.

-Esteves SC, Roque M, Bedoschi GM, Conforti A, Humaidan P, Alviggi C. Defining low prognosis patients undergoing assisted reproductive technology: POSEIDON criteria-The Why. *Front Endocrinol* 2018;9:461.

-Esteves SC, Carvalho JF, Bento FC, Santos J. A novel predictive model to estimate the number of mature oocytes required for obtaining at least one euploid blastocyst for transfer in couples undergoing *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection: the ART calculator. *Front Endocrinol* 2019; 28;10:99.

-Esteves SC, Conforti A, Sunkara SK, Carbone L, Picarelli S, Vaiarelli A, Cimadomo D, Rienzi L, Ubaldi FM, Zullo F, Anderse CY, Orvieto R, Humaidan P, Alviggi C. Improving Reporting of Clinical Studies Using the POSEIDON Criteria: POSORT Guidelines. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:587051.

-Fauser BC, Edwards RG. The early days of IVF. *Hum Reprod Update* 2005;11(5):437-8.

-Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli MC, D'Angelo A, Farfalli V, Montanaro N. Exogenous luteinizing hormone in controlled ovarian hyperstimulation for assisted reproduction techniques. *Fertil Steril*. 2004;82:1521-1526.

-Ferraretti A, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011;26:1616-24.

-Fevold HL. Synergism of follicle stimulating and luteinizing hormone in producing estrogen secretion. *Endocrinology* 1941;28:33-36.

-Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott Jr RT. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril* 2014;101:656-63.

-Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 2001;55:1341-57.

-Gallot V, Berwanger Da Silva AL, Genro V, Grynberg M, Frydman N, Fanchin R. Antral follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone administration assessed by the Follicular Output RaTe (FORT) may predict in vitro fertilization–embryo transfer outcome. *Hum Reprod* 2012;27:1066-1072.

-Garcia A, Salaheddine M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 1998;50:575-85.

-Garcia-Jimenez G, Zarinan T, Rodriguez-Valentin R, Mejia-Dominguez NR, Gutierrez-Sagal R, Hernandez-Montes G, Tovar A, Arechavaleta-Velasco F, Canto P, Granados J, Moreno-Macias H, Tusié-Luna T, Pellicer A, Ulloa-Aguirre A. Frequency of the T307A, N680S, and –29G>A single-

nucleotide polymorphisms in the follicle-stimulating hormone receptor in Mexican subjects of Hispanic ancestry. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16:100.

-Genro VK, Grynberg M, Scheffer JB, Roux I, Frydman R, Fanchin R. Serum anti-Mullerian hormone levels are negatively related to Follicular Output RaTe (FORT) in normo-cycling women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Hum. Reprod* 2011;26:671-677.

-Genro VK, Matte U, De Conto E, Cunha-Filho JS, Fanchin R. Frequent polymorphisms of FSH receptor do not influence antral follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone administration as assessed by the Follicular Output RaTe (FORT). *J Assist Reprod Genet* 2012;29:657-63.

-Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 1989;87:223-30.

-Ginther OJ, Jacob JC, Gastal MO, Gastal EL, Beg MA. Development of one vs multiple ovulatory follicles and associated systemic hormone concentrations in mares. *Reprod Domest Anim* 2009;44:441-9.

-Goodman AL, Hodgen GD. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 1983;39:1-73.

-Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Harper JC. ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod* 2009;24:1786-810.

- Gordon K, Hodgen GD. GnRH Agonists and Antagonists in Assisted Reproduction. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1992;6(2):247-65.
- Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986;1:81-87.
- Gougeon A. Dynamics of human follicular growth: a morphologic perspective. In: Adashi E, Leung P (eds.), *Comprehensive Endocrinology: The Ovary*. New York: Raven Press;1993:21-39.
- Greb RR, Behre HM, Simoni M. Pharmacogenetics in ovarian stimulation - current concepts and future options. *Reprod Biomed Online* 2005;11:589-600.
- Greep RO, van Dyke HB, Chow BF. Gonadotropin of swine pituitary: various biological effect of purified thykentrin FSH and pure matakentrin (ICSH). *Endocrinology* 1942;30:635-649.
- Grigorova M, Punab M, Ausmees K, Laan M. FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men. *Hum Reprod Oxf Engl* 2008;23:2160-2166
- Haahr T, Dosouto C, Alviggi C, Esteves SC, Humaidan P. Management Strategies for POSEIDON Groups 3 and 4. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:614.
- Haavisto AM, Pettersson K, Bergendahl M, Virkamaki A, Huhtaniemi I. Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1257-63.

-Hassan A, Kotb M, AwadAllah A, Wahba A, Shehata N. Follicular output rate can predict clinical pregnancy in women with unexplained infertility undergoing IVF/ICSI: a prospective cohort study. *Reprod BioMed Online* 2017;34:598-604.

-Hodgen G. The dominant ovarian follicle. *Fertil Steril* 1982;38:281-300.

-Huirne JA, Homburg R, Lambalk CB. Are GnRH Antagonists Comparable to Agonists for Use in IVF? *Hum Reprod* 2007;22(11):2805-13.

-Humaidan P, Alviggi C, Fischer R, Esteves SC. The novel POSEIDON stratification of 'Low prognosis patients in Assisted Reproductive Technology' and its proposed marker of successful outcome. *F1000Res* 2016;23;5:2911.

-Huhtaniemi I, Jiang M, Nilsson C, Pettersson K. Mutations and polymorphisms in gonadotropin genes. *Mol Cell Endocrinol* 1999;151:89-94.

-Jacob JC, Gastal EL, Gastal MO, Carvalho GR, Beg MA, Ginther OJ. Follicle deviation in ovulatory follicular waves with one or two dominant follicles in mares. *Reprod Domest Anim* 2009; 44:248-54.

-Jun JK, Yoon JS, Ku SY, Choi YM, Hwang KR, Park SY, Lee GH, Lee WD, Kim SH, Kim JG, Moon SY. Follicle-stimulating hormone receptor gene polymorphism and ovarian responses to controlled ovarian hyperstimulation for IVF-ET. *J Hum Genet* 2006;51:665-70.

-Keefe D, Kumar M, Kalmbach K. Oocyte competency is the key to embryo potential. *Fertil Steril* 2015;103:317-22.

- Knight PG, Glister C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci* 2003;78(3- 4):165-83.
- Knobil E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Progress in Hormone Research* 1980;36:53-88.
- Kuang Y, Chen Q, Hong Q, Lyu Q, Ai A, Fu Y, Shoam Z. Double stimulations during the follicular and luteal phases of poor responders in IVF/ICSI programmes (Shanghai protocol). *Reprod Biomed Online* 2014;29(6):684-91.
- Laisk-Podar T, Kaart T, Peters M, Salumets A. Genetic variants associated with female reproductive ageing—potential markers for assessing ovarian function and ovarian stimulation outcome. *Reprod Biomed Online* 2015;31:199-209.
- La Marca A, Papaleo E, Alviggi C, Ruvolo G, De Placido G, Candiani M, Cittadini E, De Michele F, Moriondo V, Catellani V, Volpe A, Simoni M. The combination of genetic variants of the FSHB and FSHR genes affects serum FSH in women of reproductive age. *Hum Reprod* 2013;28: 1369-74.
- Lambalk CB, Banga FR, Huirne JA, Toftager M, Pinborg A, Homburg R, van der Veen F, van Wely M. GnRH Antagonist Versus Long Agonist Protocols in IVF: A Systematic Review and Meta-Analysis Accounting for Patient Type. *Hum Reprod Update* 2017;23(5):560-79.
- Latronico AC, Chai Y, Arnhold IJ, Liu X, Mendonca BB, Segaloff DL. A homozygous microdeletion in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor. *Mol Endocrinol Baltim Endocrinol* 1998;12:442-450.

-Lazaros LA, Hatzi EG, Pamporaki CE, Sakaloglou PI, Xita NV, Markoula SI, Stefos TI, Zikopoulos KS, Georgiou IA. The ovarian response to standard gonadotrophin stimulation depends on FSHR, SHBG and CYP19 gene synergism. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:1185-91.

-Letourneau JM, Ebbel EE, Katz PP, Oktay KH, McCulloch CE, Ai WZ, Chien AJ, Melisko ME, Cedars MI, Rosen MP. Acute ovarian failure underestimates age-specific reproductive impairment for young women undergoing chemotherapy for cancer. *Cancer* 2012;118(7):1933-9.

-Levallet J, Pakarinen P, Huhtaniemi IT. Follicle-stimulating hormone ligand and receptor mutations, and gonadal dysfunction. *Arch Med Res* 1999;30(6):486-94.

-Lindgren I, Baath M, Uvebrant K, Dejmek A, Kjaer L, Henic E, Bungum M, Bungum L, Cilio C, Leijonhufvud I, Skouby S, Andersen CY, Giwercman YL. Combined assessment of polymorphisms in the LHCGR and FSHR genes predict chance of pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 2016;31:672-83.

-Linee Guida AIOM 2018 Preservazione della fertilità in pazienti oncologici.

-Lisi F, Rinaldi L, Fishel S, Lisi R, Pepe GP, Picconeri MG, Campbell A. Use of recombinant LH in a group of unselected IVF patients. *Reprod Biomed Online* 2002;5:104-8.

-Macklon NS, Fauser BC. Regulation of follicle development and novel approaches to ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update* 2000;6:307-12.

-Macklon NS, Fauser BC. Follicle stimulating hormone and advanced follicle development in human. *Archives of Medical Research* 2001;32:595-600.

- Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC, Fauser BC. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr Rev* 2006;27(2):170-207.
- Marut EL, Williams RF, Cowan BD, Lynch A, Lerner SP, Hodgen GD. Pulsatile pituitary gonadotropin secretion during maturation of the dominant follicle in monkeys: estrogen positive feedback enhances the biological activity of LH. *Endocrinology* 1981;109:2270-2272.
- McGee E, Hsueh A. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21:200-214.
- McNatty KP, Hillier SG, van den Boogaard AM, Trimbos-Kemper TC, Reichert LE, van Hall EV. Follicular development during the luteal phase of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:1022-31.
- Meirow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum Reprod* 1999;14:1903-1907.
- Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 2001;7(6):535-43.
- Messinis IE, Templeton AA. The importance of follicle-stimulating hormone increase for folliculogenesis. *Hum Reprod*. 1990;5:153-6.

- Moenter SM, Brand RC, Karsch FJ. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology* 1992;130:2978-2984.
- Moffat R, Pirtea P, Gayet V, Wolf JP, Chapron C, de Ziegler D. Dual ovarian stimulation is a new viable option for enhancing the oocyte yield when the time for assisted reproductive technology is limited. *Reprod Biomed Online* 2014;29:659-61.
- Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update* 2012;18(5):525-35.
- Nenonen HA, Lindgren IA, Prah AS, Trzybulska D, Kharraziha I, Hulten M, Giwercman YL, Henic E. The N680S variant in the follicle-stimulating hormone receptor gene identifies hyperresponders to controlled ovarian stimulation. *Pharmacogenet Genomics* 2019;29:114-120.
- Nilsson C, Pettersson K, Millar RP, Coerver KA, Matzuk MM, Huhtaniemi I. Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. International Collaborative Research Group. *Fertil Steril* 1997;67:998-1004.
- Nordhoff V, Sonntag B, Von Tils D, Gotte M, Schuring AN, Gromoll J, Redmann K, Casarini L, Simoni M. Effects of the FSH receptor gene polymorphism p.N680S on cAMP and steroid production in cultured primary human granulosa cells. *Reprod Biomed Online* 2011;23:196-203.
- Oktem O, Oktay K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. *Cancer Res* 2007;67(21):10159-62.

-Overbeek A, Kuijper EAM, Hendriks ML, Blankenstein MA, Ketel IJG, Twisk JWR, Hompes PGA, Homburg R, Lambalk CB. Clomiphene citrate resistance in relation to follicle-stimulating hormone receptor Ser680Ser-polymorphism in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Oxf Reprod* 2009;24:2007-2013.

-Pache TD, Wladimiroff JW, deJong FH, Hop WC, Fauser BC. Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 1990;54:638-42.

-Patrelli TS, Berretta R, Gizzo S, Pezzuto A, Franchi L, Lukanovic A, Nardelli GB, Modena AB. CA 125 serum values in surgically treated endometriosis patients and its relationships with anatomic sites of endometriosis and pregnancy rate. *Fertil Steril* 2011;95:393-6.

-Pellicer A, Gaitin P, Neuspiller F, Ardiles G, Albert C, Remohi J, Simon C. Ovarian follicular dynamics: from basic science to clinical practice. *J Reprod Immunol* 1998;39:29-61.

-Perez Mayorga M, Gromoll J, Behre HM, Gassner C, Nieschlag E, Simoni M. Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3365-9.

-Pezzuto A, Ferrari B, Coppola F, Nardelli GB. LH supplementation in down-regulated women undergoing assisted reproduction with baseline low serum LH levels. *Gynecol Endocrinol* 2010;26:118-24.

-Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 1988;30:751-62.

-Pieterse MC, Vos PL, Kruip TA, Wurth YA, van Beneden TH, Willems AH, Taverne MA. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 1991;35:857-62.

-POSEIDON Group (Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number), Alviggi C, Andersen CY, Buehler K, Conforti A, De Placido G, Esteves SC, Fischer R, Galliano D, Polyzos NP, Sunkara SK, Ubaldi FM, Humaidan P. A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertil Steril* 2016;105(6):1452-3.

-Ramaraju, GA, Cheemakurthi R, Prathigudupu K, Balabomma KL, Kalagara M, Thota S, Kota M. Role of Lh polymorphisms and r-hLh supplementation in GnRh agonist treated ART cycles: a cross sectional study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2018;222:119-125.

-Riccetti L, De Pascali F, Gilioli L, Santi D, Brigante G, Simoni M, Casarini L. Genetics of gonadotropins and their receptors as markers of ovarian reserve and response in controlled ovarian stimulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017;44:15-25.

-Rull K, Grigorova M, Ehrenberg A, Vaas P, Sekavin A, Nommemees D, Adler M, Hanson E, Juhanson P, Laan M. FSHB -211 G>T is a major genetic modulator of reproductive physiology and health in childbearing age women. *Hum Reprod Oxf Reprod* 2018;33:954-966.

-Ruth KS, Beaumont RN, Tyrrell J, Jones SE, Tuke MA, Yaghootkar H, Wood AR, Freathy RM, Weedon MN, Frayling TM, Murray A. Genetic evidence that lower circulating FSH levels lengthen menstrual cycle, increase age at menopause and impact female reproductive health. *Hum Reprod* 2016;31:473-481.

-Schipper I, Hop WCJ, Fauser BC. The Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Threshold/Window Concept Examined by Different Interventions with Exogenous FSH during the Follicular Phase of the Normal Menstrual Cycle: Duration, Rather Than Magnitude, of FSH Increase Affects Follicle Development. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(4):1292-8.

-Schoemaker J, van Weissenbruch MM, Scheele F, van der Meer M. The FSH threshold concept in clinical ovulation induction. *Balliere Clin Obstet Gynecol* 1993;7:297-308.

-Schoot DC, Coelingh Bennink HJ, Mannaerts BM, Lamberts SW, Bouchard P, Fauser BC. Human recombinant follicle stimulating hormone induces growth of preovulatory follicles without concomitant increase in androgen and oestrogen biosynthesis in women with isolated gonadotrophin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:1471-73.

-Schüring AN, Busch AS, Bogdanova N, Gromoll J, Tüttelmann F. Effects of the FSH-b-subunit promoter polymorphism -211G→T on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in normally cycling women indicate a gender-specific regulation of gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E82-E86.

-Sighinolfi G, Sunkara SK, La Marca A. New strategies of ovarian stimulation based on the concept of ovarian follicular waves: from conventional to random and double stimulation. *Reprod Biomed Online* 2018;37:489-97.

-Simon B, Lee SJ, Partridge AH, Runowicz CD. Preserving fertility after cancer. *CA Cancer J Clin* 2005;55:211-28.

- Simoni M, Casarini L. Mechanisms in endocrinology: genetics of FSH action: a 2014-and-beyond view. *Eur J Endocrinol* 2014;70:R91-107.
- Solé X, Guinò E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22:1928-1929.
- Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004;10:251-266.
- Sudo S, Kudo M, Wada S, Sato O, Hsueh AJ, Fujimoto S. Genetic and functional analyses of polymorphisms in the human FSH receptor gene. *Mol Hum Reprod* 2002;8:893-9.
- Sullivan MW, Stewart-Akers A, Krasnow JS, Berga SL, Zeleznik AJ. Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(1):228-32.
- Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N, Bhattacharya S, Zamora J, Coomarasamy A. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod* 2011;7:1768-1774.
- Sunkara SK, Coomarasamy A, Faris R, Braude P, Khalaf Y. Long gonadotropin-releasing hormone agonist versus short agonist versus antagonist regimens in poor responders undergoing *in vitro* fertilization: a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2014;101:147-53.

- The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group (2004). Revised 2003 Consensus on diagnostic criteria and long-term health risk related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2004;81(1):19-25.
- Trevisan CM, Peluso C, Cordts EB, R de O, Christofolini DM, Barbosa CP, Bianco B. Ala307Thr and Asn680Ser polymorphisms of FSHR gene in human reproduction outcomes. *Cell Physiol Biochem Int Biochem* 2014;34:1527-1535.
- Tohlob D, Abo Hashem E, Ghareeb N, Ghanem M, Elfarahaty R, Byers H, Pemberton P, Roberts SA, Newman WG, Mohiyiddeen L. Association of a promoter polymorphism in FSHR with ovarian reserve and response to ovarian stimulation in women undergoing assisted reproductive treatment. *Reprod Biomed Online* 2016;33:391-7.
- Tonetta SA, Zerega GSD. Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr Rev* 1989;10:205-229.
- Tsampras N, Gould D, Fitzgerald CT. Double ovarian stimulation (DuoStim) protocol for fertility preservation in female oncology patients. *Hum Fertil (Camb)* 2017;20:248-53.
- Tsutsumi R., Webster N.J. GnRH Pulsatility, the Pituitary Response and Reproductive Dysfunction. *Endocrine Journal* 2009;56(6):729-737.
- Ubaldi FM, Capalbo A, Vaiarelli A, Cimadomo D, Colamaria S, Alviggi C, Trabucco E, Venturella R, Vajta G, Rienzi L. Follicular versus luteal phase ovarian stimulation during the same menstrual cycle (DuoStim) in a reduced ovarian reserve population results in a similar euploid blastocyst formation rate: new insight in ovarian reserve exploitation. *Fertil Steril* 2016;105(6):1488-1495.

-Ubaldi FM, Cimadomo D, Capalbo A, Vaiarelli A, Buffo L, Trabucco E, Ferrero S, Albani E, Rienzi L, Levi Setti PE. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy testing in women older than 44 years: a multicenter experience. *Fertil Steril* 2017;107:1173-80.

-Vaiarelli A, Venturella R, Vizziello D, Bulletti F, Ubaldi FM. Dual ovarian stimulation and random start in assisted reproductive technologies: from ovarian biology to clinical application. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017;29(3):153-159.

-Vaiarelli A, Cimadomo D, Trabucco E, Vallefucio R, Buffo L, Dusi L, Fiorini F, Barnocchi N, Bulletti FM, Rienzi L, Ubaldi FM. Double Stimulation in the Same Ovarian Cycle (DuoStim) to Maximize the Number of Oocytes Retrieved From Poor Prognosis Patients: A Multicenter Experience and SWOT Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018a;14;9:317.

-Vaiarelli A, Cimadomo D, Ubaldi N, Rienzi L, Ubaldi FM. What is new in the management of poor ovarian response in IVF? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2018b;30:155-62.

-Vaiarelli A, Cimadomo D, Petriglia C, Conforti A, Alviggi C, Ubaldi N, Ledda S, Ferrero S, Rienzi L, Ubaldi FM. DuoStim – a reproducible strategy to obtain more oocytes and competent embryos in a short time-frame aimed at fertility preservation and IVF purposes. A systematic review. *Ups J Med Sci* 2020;125(2):121-130.

-Van Santbrink EJ, Hop WC, van Dessel TJ, de Jong FH, Fauser BC. Decremental follicle-stimulating hormone and dominant follicle development during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 1995 Jul;64(1):37-43.

-Venturella R, Vaiarelli A, Cimadomo D, Pedri S, Lico D, Mazzilli R, Mocciano R, Rienzi L, Di Carlo C, Ubaldi FM, Zullo F. State of the art and emerging drug therapies for female infertility. *Gynecol Endocrinol* 2019;29:1-7.

-Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* 1992;326:179-183.

-Wood EG, Batzer FR, Corson SL. Ovarian response to gonadotrophins, optimal method for oocyte retrieval and pregnancy outcome in patients with vaginal agenesis. *Hum Reprod* 1999;14(5):1178-81.

-Yan Y, Gong Z, Zhang L, Li Y, Li X, Zhu L, Sun L. Association of follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms with ovarian response in Chinese women: a prospective clinical study. *PLoS One* 2013;8(10):e78138.

-Yilmaz FY, Görkemli H, Çolakoglu MC, Aktan M, Gezginç K. The evaluation of recombinant LH supplementation in patients with suboptimal response to recombinant FSH undergoing IVF treatment with GnRH agonist down-regulation. *Gynecol Endocrinol* 2015;31:141-4.

-Yong PYK, Baird DT, JooThong K, McNeilly AS, Anderson RA. Prospective analysis of the relationships between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulate. *Hum Reprod* 2003;8:35-44.

-Youssef MA, Van der Veen F, Al-Inany HG, Mochtar MH, Griesinger G, Nagi Mohesen M, Aboufoutouh I, van Wely M. Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Versus HCG for Oocyte Triggering in Antagonist-Assisted Reproductive Technology. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;10:CD008046.

-Yovich JL, Alsbjerg B, Conceicao JL, Hinchliffe PM, Keane KN. PIVET rFSH dosing algorithms for individualized controlled ovarian stimulation enables optimized pregnancy productivity rates and avoidance of ovarian hyperstimulation syndrome. *Drug Design Dev Ther* 2016;10:2561-73.

-Zalewski G, Wolczynski S, Chyczewski L. Association of rs6166 polymorphism with FSH receptor transcript variants and steroid production in human granulosa cell cultures. *Syst Biol Reprod Med* 2013;59:191-8.

-Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, Rienzi L, Sunde A, Schmidt L, Cooke ID, Simpson JL, van der Poel S. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Hum Reprod Oxf Reprod* 2017;32:1786-1801.

-Zelevnik AJ. Follicle selection in primates: “many are called but few are chosen”. *Biol Reprod* 2001;65:655-659.